



HAL
open science

Mécanismes différentiels de répression transcriptionnelle des gènes cibles de HIC1

Capucine van Rechem

► **To cite this version:**

Capucine van Rechem. Mécanismes différentiels de répression transcriptionnelle des gènes cibles de HIC1. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00420474

HAL Id: tel-00420474

<https://theses.hal.science/tel-00420474>

Submitted on 29 Sep 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE II

Année 2009

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Capucine VAN RECHEM – FLEURIEL

Le 28 Septembre 2009

**Mécanismes différentiels de répression transcriptionnelle
des gènes cibles de HIC1**

Jury

Prof. Véronique CLAVEY, Présidente

Dr. Stéphane ANSIEAU, Rapporteur

Dr. Pierre-Antoine DEFOSSEZ, Rapporteur

Dr. Franck DEQUIEDT, Examineur

Prof. Olivier ROHR, Examineur

Dr. Dominique LEPRINCE, Directeur de Thèse

RESUME

HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) est un répresseur transcriptionnel codé par un gène suppresseur de tumeur localisé en 17p13.3. Cette région est perdue ou inactivée par hyperméthylation dans de nombreux cancers humains ; et les souris hétérozygotes *Hic^{+/-}* développent des tumeurs spontanées avec une incidence beaucoup plus élevée que les souris contrôle.

Cette protéine est impliquée dans des boucles de régulation complexes impliquant p53, la désacétylase de classe III SIRT1 ainsi qu'une des protéines de contrôle du cycle cellulaire, E2F1.

En réponse aux dommages à l'ADN, HIC1 réprime *SIRT1*, ce qui a pour conséquence l'augmentation du taux de p53 acétylée active. Ceci conduit à l'apoptose et à l'arrêt du cycle cellulaire. *HIC1* étant lui-même activé par p53, cette boucle peut s'auto entretenir. Cette voie est également régulée par le métabolisme puisque la répression de *SIRT1* par HIC1 est due, notamment, au corépresseur CtBP, lui-même régulé par la balance NADH/NAD⁺.

D'autre part, et de manière intrinsèquement liée, cette même réponse aux dommages à l'ADN induit l'expression de *HIC1* par E2F1. Ceci mène à une seconde boucle de régulation puisque HIC1 réprime *E2F1*, notamment lors de la phase de quiescence G0.

Cette présente étude porte sur les différents mécanismes de répression transcriptionnelle mis en place par HIC1, sur ses gènes cibles déjà connus et nouvellement identifiés.

Nous avons pu identifier un nouveau corépresseur de HIC1, MTA1, un membre du complexe NuRD, dont le recrutement est contrôlé par la compétition SUMOylation/Acétylation de la Lysine 314 de HIC1. De manière cohérente avec le rôle de HIC1 dans le contrôle de la croissance, le complexe HIC1-MTA1 est lié au promoteur de nouveaux gènes cibles, *p57KIP2* et *Cycline D1*, dans des cellules quiescentes, ainsi qu'à un site nouvellement identifié au sein du promoteur de *SIRT1*.

Tandis que le complexe NuRD apparaît réguler une majorité des gènes cibles de HIC1 connus à ce jour, ce n'est pas le cas pour CtBP, qui régulerait *SIRT1* et un gène identifié récemment, *CXCR7*.

De plus, HIC1 interagit avec le complexe SWI/SNF composé de l'ATPase BRG1 et de la sous-unité appartenant aux complexes répresseurs ARID1A, et ce pour réprimer *E2F1*, mais pas *SIRT1*, au sein de cellules primaires quiescentes.

Ces résultats suggèrent la mise en place par HIC1 de mécanismes de répression transcriptionnelle complexes et finement régulés en fonction du type de gènes cibles et de l'état de la cellule.

A Maurice et Evelyne,

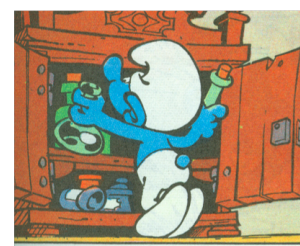
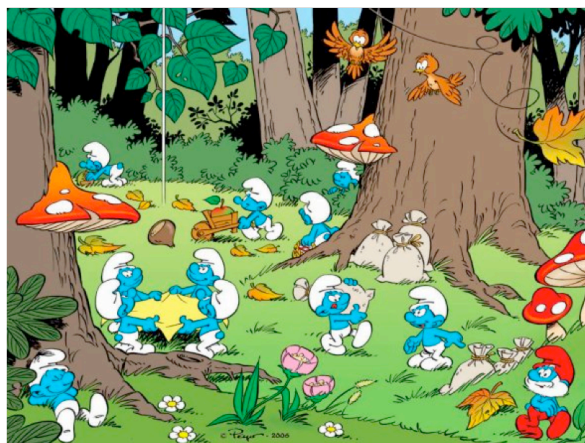
Devenir Docteur en Schtroumpf...



DEA
(Oups! Master 2)



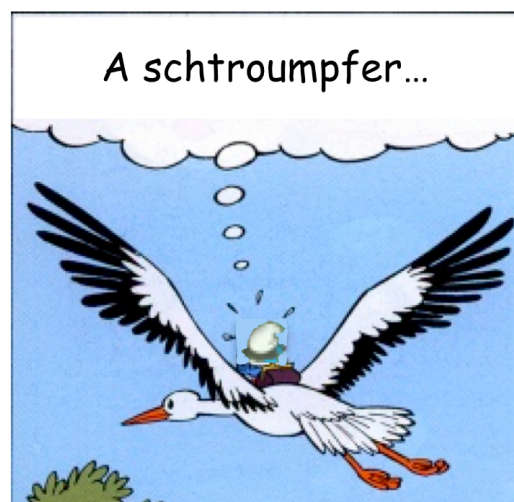
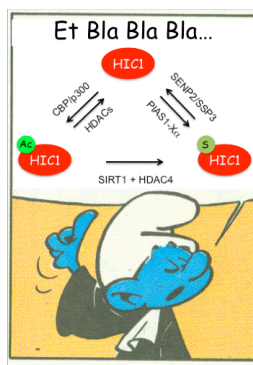
Début de thèse...



Puis rapidement...



Et... Enfin ?...



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Yvan De Launoit pour m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury.

Je remercie le Docteur Stéphane Ansieau et le Docteur Pierre-Antoine Defossez pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et pour avoir donné de leur temps à la lecture de ce « petit » manuscrit.

Je remercie également le Professeur Véronique Clavey, le Docteur Franck Dequiedt et le Professeur Olivier Rohr pour avoir accepté d'examiner mon travail de Thèse.

Le plus grand Merci au Docteur Dominique Leprince. Grâce à toi le Schtroumpf Grognon a bien grandi depuis son DEA... Qui sait, il deviendra peut-être à son tour le Grand Schtroumpf favori de ses étudiants (et pourra se souvenir du temps où il était dans les éprouvettes...). En tout cas c'est avec regrets que je quitterai ton groupe ; et j'espère atterrir dans une contrée où (peut être ma ?) future chef m'apportera autant de choses que tu as pu le faire tout au long de ces courtes années. Et ben elle va avoir du boulot !

Merci à toutes celles et ceux qui ont fait ou font encore partie du groupe HIC. L'indéracinable Celine, les anciens thésards Sophie et Seb, les anciens post-docs Tony, Valérie et Majid, et les nouvelles Vanessa et Béné. Mais surtout :

Merci Nico, et oui on a un seul mentor pendant sa thèse, qui en général est le thésard précédant. Moi j'ai eu du bol de tomber sur toi ! Merci donc, évidemment pour toutes les petites (et grosses) techniques de manipes, mais surtout pour tous les bons moments passés au cours de ces deux années qui furent trop courtes, tu resteras mon voisin de bureau favori ! J'espère vraiment avoir l'occasion de te recroiser plus longuement que les « petits coucou » de maintenant. Bon ok, dans un futur proche ça va être difficile. Mais je

suis sûre qu'au pire on pourrait ouvrir un « marchand de fleurs – loueur de vieux films pourris », faudra qu'on en discute autour d'une prochaine bière !

Merci à mon p'tit Gaylord... Lorsque le maître se retire, cela signifie que Padawan est devenu Jedi ; et ben voilà ! Il va maintenant falloir que tu continues sans moi, mais j'ai comme qui dirait l'impression que ça ne va pas être trop dur... Tu devrais t'en sortir comme un pro, certes un peu beaucoup tatillon et névrosé des choses trop bien faites, mais ce n'est pas forcément un gros défaut. En tout cas bon courage Anne-Laure pour la maison. A ce propos, je voulais te demander : quand il fait le ménage est-ce qu'il met un sopalin sous le seau ?... Mais surtout Merci pour toutes ces choses que je n'énumèrerais pas ici (on n'est pas là pour faire un roman), mais tu les connais.

Je remercie également Nini et Marie-Christine, vous resterez mes secrétaires favorites. Je sais que ce n'est pas très original et que tout le monde vous le dit, mais si on se répète tous c'est qu'il y a vraiment de bonnes raisons de vous le dire !

Merci à toutes celles et ceux qui m'ont permis de passer de bons moments dans le labo, le midi (et y'en a eu en 5 ans !), le soir, le week-end, pendant les « vacances » quand on est presque tous seuls... Bref, tout le monde devrait se reconnaître !

Dans un registre complètement différent, Merci à mes autres « collègues » de défoulement et de détente – soirées – compétitions – etc..., indispensables à une Thèse réussie. En particulier à ceux du club de Hockey Subaquatique du LUC. Grâce à vous j'ai découvert le sport idéal et la belle-famille qui va avec...

Et enfin et surtout, Merci Max. Finalement c'est facile de changer de nom, même en pleine rédaction de Thèse ! Et que nos aventures continuent sous de nouveaux horizons...

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I. Epigénétique et cancer.....	1
A. Le cancer	1
B. L'épigénétique	2
1) Définition	2
2) La méthylation de l'ADN.....	3
3) Les modifications post-traductionnelles des histones	4
4) Les micros ARN	6
C. Implication de l'épigénétique dans la cancérisation	6
1) Perturbation de la trame de méthylation de l'ADN.....	6
2) Perturbation des modifications d'histones	7
3) La cellule souche cancéreuse.....	8
II. La répression transcriptionnelle	9
A. Généralités	9
1) Dialogues épigénétiques.....	9
2) Le code des histones	10
3) Les modifications d'histones et l'état chromatinien	12
B. Les complexes de répression transcriptionnelle.....	13
1) De multiples complexes de répression	13
• Les complexes à activité ATPase « en bref ».....	14
• Les complexes modifiant les histones	15
o Sin3	15
o PcG.....	16
• Les « super complexes »	18
• Les corépresseurs : l'exemple de CtBP	18
2) Les complexes à activité ATPase.....	20
• SWI/SNF.....	20

o Composition.....	20
o Fonctionnement.....	22
o Rôles.....	23
o Antagonisme SWI/SNF – ISWI	26
• NuRD.....	27
o Mi2	27
o HDAC1 et 2	28
o RbAp46 et 48.....	28
o P66 α et β	29
o MBD2 et 3	29
o MTA1, 2 et 3.....	30
C. Quand la complexité s'en mêle : le cas « simple » de BCL6	35
1) Du gène à la protéine	35
2) Fonctions de BCL6	37
3) Mécanismes d'action	40
• Le domaine BTB/POZ.....	40
• La région centrale.....	41
• Les doigts de zinc.....	42
4) Des mécanismes moléculaires aux applications thérapeutiques	43
D. Quand la complexité se complexifie : le cas des protéines BCL11	
.....	44
1) Caractérisation	44
2) Oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs ?	46
3) Les mécanismes d'action de ces protéines	47
• Corépresseurs	47
• Répresseurs transcriptionnels directs	48
• Activateur	48
• Autre mécanisme.....	49
4) Les fonctions des protéines BCL11	50
• BCL11A.....	50
o Système immunitaire.....	50
o Hémoglobine foetale.....	51
• BCL11B.....	52

o	Système immunitaire.....	52
o	Apoptose.....	53
o	VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)	54
o	Développement neuronal.....	55
o	Développement de la peau	56
o	Développement des dents.....	56
III.	La SUMOylation.....	56
A.	Généralités	56
1)	Les protéines SUMO.....	56
2)	Les sites de SUMOylation	58
3)	Le système de conjugaison/déconjugaison	58
4)	Les chaînes polySUMO	60
5)	Les régulateurs directs de SUMOylation.....	61
6)	Importance de la voie SUMO	61
B.	Fonctions.....	62
1)	Transcription.....	62
•	Répression transcriptionnelle.....	62
•	Activation transcriptionnelle.....	64
2)	Stabilité génomique	64
3)	Mitose/Méiose	65
4)	Stabilité protéique	66
5)	Transport nucléaire et transduction du signal.....	67
6)	Réponse au stress	67
IV.	Relations SUMOylation – autres modifications	68
A.	SUMOylation – Méthylation	68
B.	SUMOylation – Phosphorylation.....	70
1)	Les sites définis.....	70
2)	Agonisme Phosphorylation – SUMOylation	71
3)	Antagonisme Phosphorylation – SUMOylation	72
4)	Et complexifions un peu...	74
C.	SUMOylation – Ubiquitination	75

1) En lien avec la dégradation protéique.....	75
2) Rôles différents de la dégradation protéique.....	77
D. SUMOylation – Ubiquitination – Phosphorylation.....	79
E. SUMOylation – Acétylation	81
F. SUMOylation – Acétylation – Phosphorylation	82
V. HIC1 : une cible et un acteur de modifications post- traductionnelles ?.....	84
A. HIC1 et le cancer	84
1) Découverte de <i>HIC1</i>	84
2) Implication dans les tumeurs solides	85
3) Implication dans les hémopathies malignes	86
4) <i>HIC1</i> : un gène suppresseur de tumeurs	87
5) Relations <i>HIC1/p53</i>	88
6) <i>HIC1</i> : un gène pré marqué des cellules souches cancéreuses ?.....	89
B. HIC1 et le syndrome de Miller-Dieker.....	90
C. HIC1 est un répresseur transcriptionnel	92
1) La protéine HIC1	92
2) Répression directe	95
• Liaison à l'ADN	95
• <i>FGF-BP1</i>	95
• <i>ATOH1</i>	96
• <i>E2F1</i>	99
3) Répression indirecte.....	99
4) Focus sur le contrôle de l'activité d'un gène cible direct : <i>SIRT1</i>	101
• L'acétylation.....	101
• <i>SIRT1</i> : oncogène ou gène suppresseur de tumeurs ?.....	102
• <i>SIRT1</i> est finement régulée à différents niveaux	103
D. Les boucles de régulation	105

RESULTATS	111
I. Introduction	111
II. Publication n°1	113
III. Publication n°2.....	157
IV. Publication n°3	165
V. Etude de l'interaction entre HIC1 et les protéines BCL11	185
A. Validation de l'interaction entre HIC1, BCL11A et BCL11B.....	185
B. L'interaction entre HIC1 et BCL11 est complexe.....	187
C. A quoi ça sert ?.....	190
D. Perspectives	197
 DISCUSSION	 199
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 213
 ANNEXES	 239
I. Publication n°4	239
II. Publication n°5.....	247

ABBREVIATIONS

5-AzaC : 5-Azacytidine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger, miRNA : micro ARN

ATP : Adenosine Tri Phosphate

BCL11 : B Cell Lymphoma/leukemia 11

BTB/POZ : Broad complex, Tramtrack, Bric à brac/POx viruses and Zinc finger

CD : Cluster of Differentiation

CIMP : CpG Island Methylator Phenotype

CtBP : C terminal Binding Protein

DBD : DNA Binding Domain

DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma

DNMT : DNA Methyl Transferase

ES : Embryonic Stem

GC : Germinal Center

HAT : Histone Acetyl Transferase

HDACs : Histones deacetylases

Ig : Immunoglobuline

Kda : kilodalton

KRAB : Krüppel Associated Box

LOH : Loss of Heterozygoty

LTR : Long Terminal Repeat

MBD : Methyl CpG Binding Domain

MBP : Methyl CpG Binding Protein

MTA1 : Metastasis Associated protein

NAD⁺/NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NLS : Nuclear Localisation Signal

NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylase

PcG : Polycomb Group

PEV : Position Effect Variegation

PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT

POK : POZ and Krüppel

SENP : SUMO specific protéase

SET : Suppressor of the variegation – Enhancer of *Zeste* and *Trithorax*

SIM : SUMO Interacting Motif

STUbls : SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

TCR : T Cell Receptor

TRD : Transactivation Domain

TrxG : Trithorax Group

TSA : Trichostatine A

Ubls : Ubiquitin-like proteins modifiers

Ulp1 : Ubiquitin-like protein specific proteases

UTR : Untranslated Region

ZF : Zinc Finger

DSBs : Double Strand Breaks

MDS : Miller Dieker Syndrome

Pb : paire de bases

EGL : External Granule Layer

IGL : Internal Granule Layer

GCP : Granule Cell Precursor

Hh : Hedgehog

Shh : Sonic hedgehog

PTM : Post Translational Modification

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

RC : Région Centrale

INTRODUCTION

I. Epigénétique et cancer

A. Le cancer

Selon le dictionnaire médical, le cancer est un groupe de maladies présentant deux caractéristiques majeures : la croissance incontrôlée des cellules du corps humain et la capacité de ces cellules à se propager à des sites distants, c'est-à-dire à métastaser.

Cette maladie est la première cause de mortalité en France depuis 2007 et entraîne le décès de 8 millions de personnes par an dans le monde.

Alors que l'incidence des cancers a doublé entre 1980 et 2005, le risque de mortalité a diminué de 25%, amenant le taux de guérison à un peu plus de 50%.

Un homme sur deux et une femme sur trois seront concernés au cours de leur vie. Les cancers les plus fréquents sont celui de la prostate chez l'homme et celui du sein chez la femme. Ce ne sont pas pour autant les plus mortels. Ils sont précédés par les cancers du poumon et du colon et suivis de près par ceux du pancréas et les lymphomes et leucémies.

Chez l'Homme, l'incidence des cancers augmente exponentiellement dans les dernières décennies de la vie, avec une prédominance des carcinomes épithéliaux (DePinho, 2000).

Pour des cellules en culture le taux de mutations spontanées est de 2.10^{-7} /gène/division cellulaire (DePinho, 2000), ce qui à l'échelle du corps humain est faible comparé à la fréquence des cancers. La fréquence d'inactivation d'un gène dans une cellule tumorale est 1000 fois supérieure à celle d'une cellule normale (Quon and Berns, 2001). D'autres évènements en plus des mutations génétiques doivent donc entrer en jeu dans la cancérisation.

Plusieurs observations ont permis de montrer que des phénomènes épigénétiques sont impliqués dans la cancérisation, certainement même de manière plus importante que les perturbations génétiques.

Ces évènements ont pu être mis en évidence notamment grâce à l'étude des cancers familiaux. Des mutations, au sein de cellules de lignée germinale, de certains gènes suppresseurs de tumeurs, sont associées à des formes de cancers familiaux avec une

expansion précoce anormale ; ces gènes mutés sont transmis selon les lois de Mendel. Ces mêmes gènes sont retrouvés hyperméthylés, donc éteints transcriptionnellement, dans des cancers sporadiques (*VHL* pour le rein, *APC* pour le colon et *BRCA1* dans le cas du cancer du sein) (Ting et al., 2006).

Des études récentes chez la souris ont permis de mettre en évidence une hérédité non Mendélienne des cancers. Dans ce cas la maladie est due à une relation entre deux allèles homologues en *trans*. Cette interaction allélique cause des modifications de l'expression des gènes qui persistent à travers les générations, même si un seul allèle est présent. Ce phénomène a été baptisé paramutation : un allèle agit comme paramutateur et altère épigénétiquement l'expression du second. Cette altération épigénétique persiste à travers les générations chez les individus qui héritent de la paramutation, même en absence du paramutateur. Cette hérédité a été observée à travers 3 générations ou plus (Fleming et al., 2008).

En plus du niveau génomique, il découle donc de ces observations la notion plus vaste d'épigénome du cancer. En effet, les changements épigénétiques peuvent être des événements fondamentaux pour l'initiation tumorale.

Les modifications épigénétiques peuvent fonctionner comme un réseau dans lequel de multiples gènes sont altérés au sein d'une voie, et peuvent également modifier d'autres signalisations clés, ce qui implique des événements épigénétiques qui causent d'autres événements épigénétiques. Ces modifications peuvent cibler une cellule unique, ce qui amène au concept de cellule souche cancéreuse selon lequel une seule cellule constitue la population capable de perpétuer la tumeur. Ceci pourrait expliquer l'existence de différentes sous-populations de types majeurs tumoraux comme dans les cancers du sein (Jones and Baylin, 2007).

Cette notion de cellule souche sera détaillée plus loin.

B. L'épigénétique

1) Définition

L'épigénétique est l'étude héréditaire du changement de l'expression des gènes sans modification de la séquence de l'ADN. C'est donc un système régulateur en deçà de l'information de séquence du code génétique (Jenuwein and Allis, 2001).

Le contrôle épigénétique de l'expression des gènes est fondamental au cours du développement. Il est impliqué notamment dans l'inactivation du chromosome X chez la femelle, ainsi que dans la mise en place de l'empreinte génomique lorsqu'un allèle doit être exprimé différemment selon l'origine parentale (Wolffe and Matzke, 1999).

Les mécanismes épigénétiques établissent une base fondamentale pour la maintenance de l'identité de cellules souches embryonnaires (ES pour Embryonic Stem cells) et la mémoire cellulaire à long terme, cruciales pour le développement normal (Kim et al., 2009).

On peut distinguer trois niveaux de régulation épigénétique : la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles d'histones et la répression par micro ARN.

2) La méthylation de l'ADN

Chez les procaryotes la méthylation de l'ADN s'effectue sur les Adénines et les Cytosines, elle fait partie du système de restriction de l'hôte (Klose and Bird, 2006).

Chez les eucaryotes elle ne modifie que les Cytosines qui sont couplées à une Guanine (CpG) et est associée à un statut répressif de la chromatine. Les CpG sont souvent présents sous forme d'îlots au sein de promoteurs de gènes ou en groupes étendus dans les régions à séquences répétitives du génome. Cette modification épigénétique est indispensable puisqu'elle est essentielle à la viabilité chez la souris (Klose and Bird, 2006). Les vertébrés possèdent le plus haut taux de Cytosines méthylées dispersées dans tout le génome, elles représentent 1% de l'ADN total et affectent 70-80% de tous les CpG (Bird, 2002).

Les enzymes responsables de la mise en place de cette méthylation sont les DNMT (DNA (cytosine-5) methyltransferase). Les protéines DNMT3A et B sont des méthyltransférases *de novo* responsables de l'établissement de la trame de méthylation des Cytosines à l'ADN non méthylé. Elles fonctionnent en association avec DNMT3L qui module leur activité catalytique. Elles agissent notamment lors de l'embryogenèse précoce. En effet, après déméthylation totale du génome en vue de la reprogrammation génétique, les marques de méthylation de l'ADN sont rétablies. Puis, ce patron de méthylation est maintenu par l'enzyme de maintenance DNMT1, notamment pendant la division cellulaire (Klose and Bird, 2006) (Kim et al., 2009).

Pour l'instant, et malgré les controverses de la littérature, aucune activité déméthylase de l'ADN n'a pu être précisément caractérisée, même si l'on sait qu'elle doit exister (Kim et al., 2009).

La méthylation de l'ADN n'est pas indépendante des autres modifications épigénétiques. En effet, les gènes méthylés surexprimés dans une cellule par transfection transitoire peuvent être réactivés par traitement à la TSA (Trichostatine A), un inhibiteur d'histones désacétylases (HDACs). Cependant, les îlots CpG naturellement méthylés ne peuvent pas être réactivés par une simple application de cet inhibiteur. Le recrutement d'HDACs est donc important mais des mécanismes supplémentaires sont également nécessaires pour l'extinction des gènes dépendante de la méthylation de l'ADN (Bird and Wolffe, 1999).

3) Les modifications post-traductionnelles des histones

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il est constitué d'un octamère d'histones (un tétramère H3 H4 entre deux dimères H2A H2B) entouré de deux tours de superhélice d'ADN (147 paires de bases). Une histone est une petite protéine basique comportant un domaine globulaire C-terminal et une queue N-terminale non structurée qui sort du nucléosome. L'histone inter-nucléosomal H1 permet de mettre en place un filament de chromatine plus compacté (Jenuwein and Allis, 2001).

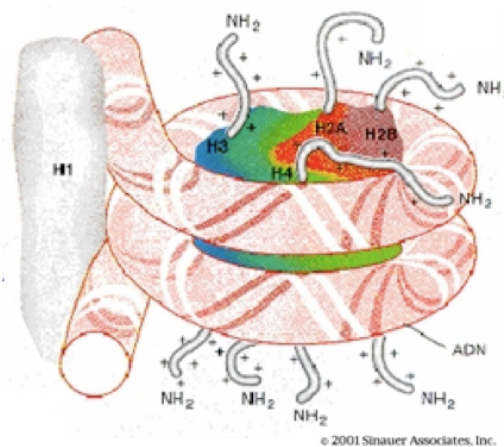


Figure 1 : Représentation schématique d'un nucléosome.

La queue N-terminale des histones, chargée positivement, peut être modifiée par ajout de différents groupements : acétylation des Lysines, méthylation des Lysines et Arginines, phosphorylation des Sérines et Thréonines, ubiquitination des Lysines, SUMOylation des Lysines, ADP-ribosylation des Acides Glutamiques, désimination des Arginines (ce qui les convertit en Citrulline) et isomérisation des Prolines. Ces modifications peuvent affecter le degré de compaction de la chromatine en affectant le contact entre les histones de nucléosomes adjacents ou l'interaction entre l'histone et l'ADN. Certaines modifications

changent la charge des histones, comme la phosphorylation ou l'acétylation qui neutralise la charge basique (Kouzarides, 2007).

Des protéines sont recrutées aux formes modifiées des queues d'histones via des domaines spécifiques pour chaque type de modification. Ainsi, la méthylation des Lysines est reconnue par les domaines « chromolike » présents dans les protéines de la famille « Royal » : les domaines chromo, tudor, MBT, ainsi que par les domaines PHD. L'acétylation est reconnue par les bromodomains et la phosphorylation par un domaine des protéines 14-3-3. Un certain nombre de protéines sont identifiées comme étant recrutées à des modifications spécifiques.

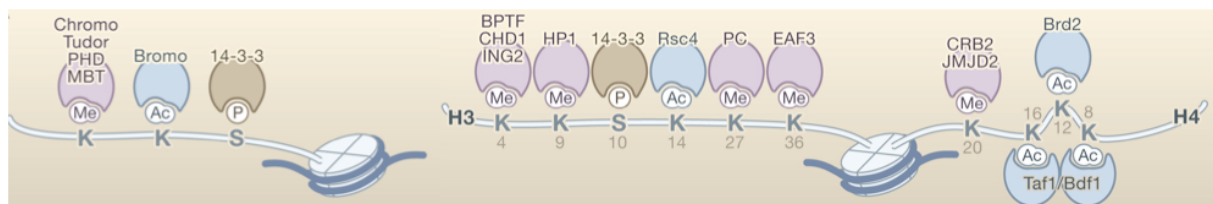


Figure 2 : Les modifications d'histones sont la cible de protéines via des domaines spécifiques (Kouzarides, 2007).

Le dialogue entre les modifications peut avoir lieu à différents niveaux. Par exemple, les différentes modifications ciblant les mêmes résidus, comme les Lysines, sont mutuellement exclusives. A un niveau supérieur, la liaison d'une protéine à un résidu peut être favorisée ou empêchée par la modification d'un résidu adjacent, ou l'activité catalytique d'une enzyme peut être compromise par modification de son site de reconnaissance sur le substrat. La communication entre les modifications peut également avoir lieu entre les différentes queues d'histones. Il découle de ces modifications l'hypothèse du code des histones selon laquelle le statut d'expression d'une région particulière de la chromatine dépend de la combinaison donnée des modifications d'histones (Kouzarides, 2007).

Les histones sont des traducteurs entre le génotype et le phénotype. Elles ont une fonction dynamique dans la régulation de la structure de la chromatine et l'activité des gènes. Elles pourraient être impliquées dans l'établissement et le maintien d'une mémoire épigénétique (Lujambio and Esteller, 2009).

Des altérations des niveaux de méthylation de l'ADN et de modifications d'histones peuvent être induites par exposition à une variété d'agents environnementaux ainsi que par le style de vie (diète par exemple) (Vaissiere et al., 2008).

4) Les micros ARN

Les miRNAs (micro ARNs) ont été récemment découverts et constituent un troisième type de régulateur épigénétique.

Ce sont des petits ARN d'une vingtaine de bases qui se lient sur des sites partiellement complémentaires de la région 3'UTR (Untranslated Region) des gènes. Ils peuvent dégrader les ARNm (ARN messagers) ou directement inhiber leur traduction. Cette répression par miRNA est une voie supplémentaire en dehors du changement de la séquence d'ADN par laquelle l'expression des gènes peut être modulée (Lopez et al., 2009).

Le profil d'expression des miRNAs est altéré dans les cancers ; ils peuvent se comporter comme gènes suppresseurs de tumeurs ou comme des oncogènes (Lujambio and Esteller, 2009).

Le cancer est une maladie génétique et épigénétique. L'épigénétique offre une explication additionnelle qui, avec la génétique, mène à une meilleure compréhension du processus malin dans son ensemble.

C. Implication de l'épigénétique dans la cancérisation

1) Perturbation de la trame de méthylation de l'ADN

Une des caractéristiques de l'épigénome du cancer est la perturbation de la trame de méthylation de l'ADN. Le taux de méthylation global ne change pas mais la distribution est différente : il est observé une déméthylation globale du génome et une hyperméthylation localisée de certains promoteurs via les îlots CpG (Ting et al., 2006). Au moins une partie de ces changements ont lieu précocément dans le développement tumoral et pourraient initier la carcinogenèse (Lopez et al., 2009).

La perte globale de méthylation dans les cancers a deux conséquences principales. Tout d'abord elle mène au réveil de régions habituellement silencieuses : celles à empreinte, mais également celles contenant des insertions virales et des transposons parasites. Elle affecte également la stabilité globale des chromosomes (Lopez et al., 2009).

Les gènes suppresseurs de tumeurs résident souvent dans des régions caractérisées par des délétions chromosomiques fréquentes. Ces délétions entraînent une perte d'hétérozygotie

(LOH pour Loss Of Heterozygoty). Au sein de certaines régions il semble que la méthylation de l'ADN précède la LOH (altération génétique) (Jones and Baylin, 2002).

La méthylation de promoteurs qui augmente de façon concomitante avec l'âge pourrait expliquer l'association âge/cancer. La méthylation *de novo* des îlots CpG s'effectue précocément pendant le processus de carcinogenèse, elle peut être détectée dans des épithéliums qui présentent encore un aspect normal (Jones and Baylin, 2002).

Les CIMP (CpG Island Methylator Phenotype), un phénotype de méthylation des îlots CpG, ont été mis en évidence par leur association avec des tumeurs qui ont une localisation proximale dans le colon. Ils ont été définis par l'observation de la concordance de l'hyperméthylation d'une série de gènes et le phénotype d'instabilité microsatellitaire (MSI) (Schuebel et al., 2006).

Les cancers avec le phénotype CIMP présentent un faible degré d'anomalies chromosomiques (McKenna and Roberts, 2009). Ces anomalies de méthylation de l'ADN sont en interaction directe avec celles des modifications d'histones. En effet, plusieurs gènes identifiés CIMP sont ciblés par les protéines du groupe Polycomb (PcG), impliquées dans la maintenance de la suppression transcriptionnelle dans les cellules ES via des modifications particulières d'histones. Le contrôle PcG est critique pour l'extinction à long terme de l'expression de gènes essentiels pour le développement et le renouvellement cellulaire adulte (Schuebel et al., 2006).

2) Perturbation des modifications d'histones

La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones contrôlent l'expression des gènes par un dialogue transversal précis impliquant plusieurs protéines et complexes différents. Au sein des cellules cancéreuses, le contrôle précis des mécanismes épigénétiques est perdu, ce qui promeut l'expression du phénotype tumoral.

Les trames de modifications d'histones sont établies très tôt dans la tumorigenèse et évoluent pendant la progression tumorale, montrant leur évidente signification biologique (Lujambio and Esteller, 2009). Des évidences expérimentales au sein de cellules de cancer du colon sous-tendent le modèle selon lequel la méthylation des histones serait mise en place lors des phases initiales d'extinction de l'expression des gènes dans le cancer. Vient ensuite la méthylation de l'ADN qui peut se propager le long du promoteur avec le temps (Baylin and Ohm, 2006). Les modifications épigénétiques pourraient donc rendre des groupes de gènes vulnérables à certaines erreurs. Ceci résulterait en une méthylation

aberrante de l'ADN des promoteurs durant la progression cancéreuse (Ohm and Baylin, 2007).

Un modèle est proposé selon lequel le cancer serait initié par des événements épigénétiques dans une population souche ou progénitrice, ce qui créerait un environnement favorable à l'accumulation de mutations génétiques additionnelles et au développement tumoral. L'instabilité génomique pourrait donc être une conséquence des événements épigénétiques conduisant à la progression tumorale et non un initiateur de carcinogénèse. Une question découle directement de ce modèle : l'instabilité génomique est-elle un événement essentiel promouvant le cancer ou une conséquence secondaire non requise pour l'initiation ou la progression cancéreuse ? Il existe plusieurs cancers agressifs pour lesquels la seule lésion génétique détectable est la perte de protéines remodelant la chromatine. Les altérations épigénétiques pourraient donc conduire au cancer en absence d'instabilité génomique (McKenna and Roberts, 2009).

3) La cellule souche cancéreuse

La contribution épigénétique dans le cancer s'étend des stades précoces de la transformation tumorale aux métastases qui sont la cause principale de mortalité chez les patients qui ont des tumeurs solides (Lujambio and Esteller, 2009).

Plusieurs études suggèrent que les cellules souches ou des progéniteurs précoces pourraient être les précurseurs à partir desquels dérivent les cellules cancéreuses. En effet, les tumeurs, qui possèdent des marqueurs de ces types cellulaires, sont constituées de populations cellulaires hétérogènes et sont caractérisées par l'augmentation de signalisations importantes pour la maintenance des cellules souches (Ohm and Baylin, 2007).

Les cellules cancéreuses du colon et du sein sont enrichies en de multiples composants de la chromatine caractéristiques des promoteurs éteints, menant à la répression transcriptionnelle en association avec une méthylation aberrante de l'ADN. Lorsque ces promoteurs sont réactivés par déméthylation de l'ADN ils ne retournent pas à un stade intégralement euchromatique. En effet, des marques répressives persistent telles que la triméthylation de la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me3) (Ohm and Baylin, 2007).

II. La répression transcriptionnelle

A. Généralités

1) Dialogues épigénétiques

La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones sont importantes pour coordonner la transcription, la réplication et les processus de réparation. Dans tous ces événements cellulaires complexes, le dialogue entre ces modifications pourrait aider au recrutement ordonné et au maintien de facteurs protéiques.

La méthylation initiale de l'ADN ou des histones attirerait les complexes répresseurs pour créer une conformation de la chromatine non favorable à la transcription. Cette altération initiale influencerait la chromatine voisine et la rendrait sujette à la propagation de la méthylation (Kim et al., 2009).

Les protéines MBP (Methyl-CpG-binding Proteins) ont été mises en évidence comme étant la clé de la connexion entre l'ADN méthylé et la répression transcriptionnelle. En effet, MeCP2 (Methyl-CpG-binding Protein 2) possède un domaine MBD (Methyl-CpG-Binding Domain) qui lie les CpG méthylés et un domaine TRD (Transcriptional Repression Domain) qui, via le régulateur transcriptionnel Sin3A, interagit avec les HDAC. D'autre part, MBD1 se lie sélectivement à l'ADN méthylé et réprime la transcription (Bird and Wolffe, 1999) (Klose and Bird, 2006).

De plus, les protéines de méthylation de l'ADN DNMT1 et 3A interagissent avec le système de méthylation des histones SUV39H1-HP1 ainsi qu'avec des HDACs (Fuks et al., 2003; Klose and Bird, 2006) (Kim et al., 2009).

Il existe donc un lien direct entre les activités enzymatiques responsables des deux niveaux de régulation épigénétiques distincts. Le remodelage de la chromatine est requis pour que la méthylation de l'ADN ait lieu. A l'inverse, la méthylation de l'ADN pourrait influencer celle des histones. Il a été mis en évidence que l'association de MeCP2 avec une activité méthyltransférase H3K9 est nécessaire pour la méthylation de cette Lysine sur un gène dont l'ADN est méthylé (Fuks et al., 2003).

Par contre, l'évènement initial de la répression transcriptionnelle n'est pas encore déterminé. Des études sur l'extinction de la transcription d'un transgène introduit dans des cellules en culture montrent que la perte de l'acétylation totale de l'histone H3, ainsi que le gain de

méthylation de sa Lysine 4, sont les premiers évènements dans le processus de mise en place de la répression. Puis survient la méthylation H3K9 et enfin l'hyperméthylation des sites CpG. La méthylation des îlots CpG serait donc un événement tardif qui pourrait mener à la fermeture du gène de manière irrévocable, d'autant plus qu'il n'y a pas d'ADN déméthylase clairement identifiée (Vaissiere et al., 2008).

Cependant, il est fort probable que, dans certains cas, l'événement initial puisse également être la méthylation de l'ADN, et que ceci soit variable selon les conditions.

Ce « dialogue épigénétique » permettrait l'auto propagation du cycle épigénétique pour la répression transcriptionnelle à long terme.

2) Le code des histones

Le code des histones joue un rôle dans la transcription mais également dans d'autres processus tels que la réparation de l'ADN, sa réplication, ou encore la condensation des chromosomes. Nous nous limiterons ici à son implication dans la transcription.

L'acétylation des histones ciblant les Lysines est associée à une chromatine transcriptionnellement active. Elle est présente à un faible niveau à travers le génome entier (Kouzarides, 2007) (Vaissiere et al., 2008).

Cette acétylation est mise en place par les enzymes HAT (Histones Acetyl-Transferases). Grâce à son effet de neutralisation de charge elle ouvre la chromatine, facilitant l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. En effet, elle diminue l'interaction inter nucléosome et entre les queues des nucléosomes et l'ADN. L'acétylation forcée par administration d'inhibiteur de désacétylases entraîne la déméthylation de promoteurs précédemment hyperméthylés. La fonction de cette modification pourrait donc être la protection contre la méthylation de l'ADN (Sims et al., 2003) (Vaissiere et al., 2008).

A l'inverse, la désacétylation des histones est associée à la répression transcriptionnelle. Il existe trois familles d'HDAC (Histone Deacetylases) nommées I, II et III selon leur homologie avec les désacétylases de levure (Kouzarides, 2007). Les HDAC de classe III ou sirtuines présentent une certaine sélectivité pour H4K16 (Vaquero et al., 2004).

La méthylation des histones est beaucoup plus spécifique. Elle peut cibler des Arginines et des Lysines et ces résidus peuvent être mono, di ou triméthylés. Ces modifications sont

mis en place, entre autres, par des protéines à domaine SET (Suppressor of the variegation - Enhancer of *Zeste* and *Trithorax*) (Morgunkova and Barlev, 2006).

Les marques associées à l'activation transcriptionnelle sont la méthylation de H3K4, H3K36 et H3K79 ; K4 et K36 étant impliquées dans l'élongation (Kouzarides, 2007).

Les marques associées à la répression de la transcription sont quant à elles la méthylation de H3K9 (bien que sa forme triméthylée soit présente au sein de la région codante des gènes transcriptionnellement actifs), H3K27 et H4K20 (Kouzarides, 2007).

Cette modification est beaucoup moins labile que l'acétylation mais est tout de même réversible. Il existe deux types principaux de déméthylases : LSD1 et JmjC. LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) a été découverte déméthylant les formes mono et diméthylées de H3K4, entraînant donc la répression transcriptionnelle (Shi et al., 2004). Cette protéine possède un domaine de localisation nucléaire NLS ainsi qu'un domaine SWIRM caractéristique des protéines associées à la chromatine (Kubicek and Jenuwein, 2004). La famille JmjC déméthyle H3K9 et H3K36 (Kouzarides, 2007).

L'ubiquitination des Lysines entraînerait le recrutement de certaines protéines et aurait un effet positif sur la transcription en ouvrant la chromatine grâce à sa taille importante (Kouzarides, 2007).

La SUMOylation, quant à elle, joue un rôle répresseur chez la levure (Kouzarides, 2007).

Il s'avère en fait que ce code des histones soit un peu plus compliqué.

Par exemple, la désacétylation des histones est essentielle pour la répression par la méthylation de H3K9. Cependant, cette méthylation seule est insuffisante pour le recrutement de HP1 à la chromatine, elle nécessite en effet la présence de SUV39H1. Le code des histones peut donc être également interprété dans le contexte d'autres facteurs associés à la chromatine. Dans ce cas c'est la combinaison d'interactions avec les histones modifiées et d'autres facteurs qui détermine si une protéine sera recrutée ou non (Stewart et al., 2005).

3) Les modifications d'histones et l'état chromatinien

Il existe deux types d'environnements chromatiniens dans le génome : l'hétérochromatine silencieuse et l'euchromatine active. Chacune est associée à un ensemble distinct de modifications.

Ces différents environnements sont délimités par des éléments frontières qui recrutent les enzymes de modification de la chromatine. Chez la levure, les frontières hétérochromatiniennes sont maintenues par la présence de méthylation de H3K4 et H3K9 dans les régions euchromatiques adjacentes (Kouzarides, 2007). Les insulateurs sont des éléments de l'ADN qui protègent un gène des influences transcriptionnelles voisines en prévenant l'activation ou la répression inappropriée du gène (Kim et al., 2009).

L'hétérochromatine possède un rôle de protection de l'extrémité des chromosomes et de séparation de ceux-ci pendant la mitose.

Elle présente un faible taux d'acétylation et un taux élevé de méthylation à certains sites (H3K9, H3K27 et H4K20). La forme triméthylée de H3K9 est associée à la compaction et à la répression transcriptionnelle de l'hétérochromatine péri-centromérique. La forme méthylée de H3K27, quant à elle, est associée à l'hétérochromatine facultative (comme l'inactivation du chromosome X) ; elle est déposée par les complexes PcG pour la répression transcriptionnelle des gènes à long terme. Elle serait donc plutôt à l'origine de l'extinction d'un gène que responsable du maintien de cet état répressif (Ting et al., 2006) (Kouzarides, 2007).

L'euchromatine correspond aux régions actives du génome. Elle peut cependant être transcriptionnellement activée ou réprimée.

La forme transcriptionnellement inactive est faiblement acétylée. Elle est associée à la diméthylation de H3K9 ainsi qu'à la méthylation de H3K27.

La forme transcriptionnellement active présente, quant à elle, de hauts taux d'acétylation de l'histone H3 et de triméthylation de H3K4, H3K36 et H3K79. Lorsque les gènes sont exprimés de manière basale, leurs promoteurs présentent une distribution identique des marques actives H3K9Ac et H3K4Me (Ting et al., 2006) (Kouzarides, 2007).

Ces états de chromatine sont donc, au moins en partie, labiles. Un exemple est le mécanisme de PEV (Position Effect Variegation) qui se traduit par l'extension de

l'hétérochromatine dans la région adjacente de gènes activement transcrits (Sims et al., 2003). La protéine formant l'hétérochromatine HP1 (Heterochromatin Protein 1), qui lie H3K9 méthylée, est essentielle dans l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine sur un gène transitoirement silencieux par le phénomène de PEV. Elle est également associée avec des gènes silencieux dans des régions euchromatiques et se trouve au cœur des boucles d'évènements qui perpétuent l'hétérochromatine (Fahrner and Baylin, 2003).

Le recrutement transitoire d'un complexe associé au domaine répresseur KRAB (Krüppel Associated Box), impliquant HP1, à un gène euchromatique, produit un état silencieux héréditaire mitotiquement qui ne requiert pas la présence d'un composant lié à l'ADN. Le traitement par un agent déméthylant l'ADN (5-AzaC pour 5 AzaCytidine) associé à un inhibiteur des HDACs (TSA pour Trichostatine A) le réactivant, l'état silencieux pourrait donc être maintenu par la méthylation de l'ADN. La PEV est donc mitotiquement héréditaire (Ayyanathan et al., 2003).

Il a été mis en évidence des domaines bivalents au sein desquels des marques auxquelles sont associées des fonctions opposées coexistent : il s'agit des formes méthylées de H3K27 (répressive) et H3K4 (activatrice). Cet enrichissement est observé au sein de cellules souches et est corrélé à un faible taux d'expression de facteurs de transcription développementaux. Lorsque ces cellules ES se différencient, et en fonction des signaux reçus, ces domaines bivalents ne conserveront qu'une seule de ces modifications. Ils ont donc une implication importante dans la préservation des propriétés de pluripotence des cellules ES (Kouzarides, 2007).

B. Les complexes de répression transcriptionnelle

1) De multiples complexes de répression

Il existe de nombreux complexes de remodelage de la chromatine que l'on peut classer en deux catégories : ceux utilisant l'énergie de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) pour mobiliser les nucléosomes et ceux qui modifient post-traductionnellement les histones et méthylent l'ADN.

Ces complexes sont recrutés à la chromatine soit directement par les facteurs de transcription, soit par l'intermédiaire de corépresseurs.

- Les complexes à activité ATPase « en bref »

Les complexes à activité ATPase utilisent l'énergie de l'ATP pour remodeler les nucléosomes. Les deux représentants majeurs de ces complexes, SWI/SNF et NuRD, seront détaillés plus loin.

ISWI (Imitation SWI) est la sous-unité ATPase d'au moins trois complexes remodelant la chromatine : ACF (ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor), CHRAC (Chromatin Accessibility Complex) et NURF (Nucleosome Remodeling Factor).

La perte de fonction de cette protéine chez la Drosophile entraîne une décondensation dramatique des chromosomes. Au sein des chromosomes polytènes de la glande salivaire, ISWI est associée à des centaines de sites euchromatiques avec une trame opposée à celle de l'ARN polymérase II, laissant présager un rôle prédominant de répression transcriptionnelle. Les défauts de compaction de la chromatine résultant de la perte de fonction de cette ATPase sont dus à une incorporation inefficace de l'histone H1 dans la chromatine *in vivo* (Corona et al., 2007).

Les complexes ISWI sont petits car constitués de 2 à 4 sous-unités. Ils possèdent une activité de répression transcriptionnelle mise en place par l'espacement régulier de multiples nucléosomes, ce qui promeut la compaction chromatique requise pour l'extinction des gènes. Cet espacement régulier est nécessaire pour replier la chromatine en fibre plus compactée (Racki and Narlikar, 2008).

Les différents complexes de répression transcriptionnelle, à activité ATPase ou de modification des histones, coopèrent au sein de mêmes voies.

Chez l'Homme, BPTF (Bromodomain and PHD finger Transcription Factor) est la grande sous-unité de NURF (NURF301 chez la Drosophile). Cette protéine, via l'un de ses domaines PHD (Plant HomeoDomain), interagit avec H3K4 triméthylée, une marque associée avec les sites d'initiation de la transcription des gènes actifs. Cette marque stabilise les complexes contenant BPTF aux gènes cibles. La reconnaissance de H3K4Me3 est essentielle pour la fonction du complexe NURF *in vivo*.

D'autre part, WDR5 (WD-Repeat protein 5) est une protéine importante pour le taux global de H3K4Me3. Sa diminution d'expression chez le Xénope, tout comme celle de BPTF, cause une dérégulation de l'expression de *Hoxc8* et donc une postériorisation de plusieurs somites. Ces deux protéines sont donc importantes pour le contrôle de l'expression des gènes *Hox*.

Deux régulateurs de la chromatine conservés, WDR5, une protéine adaptatrice essentielle à la triméthylation de H3K4, et NURF, un archétype de complexe de remodelage de la chromatine, fonctionnent au sein d'une voie biologique commune (Wysocka et al., 2006).

- Les complexes modifiant les histones

Nous ne ferons pas ici un catalogue de ces complexes mais détaillerons deux de ceux-ci : Sin3 (SWI-independent) et PcG (Polycomb Group).

- Sin3

Le « cœur » du complexe Sin3 est très conservé de la levure à l'Homme ; il est constitué de huit composants : SIN3, HDAC1, HDAC2, RbAp46, RbAp48, SAP30, SAP18 et SDS3. Ce complexe possède de multiples fonctions grâce aux interactions protéiques via SIN3 : enzymes remodelant les nucléosomes, transférases de N-acétyl-glucosamine ou encore méthyl-tranfèreses des histones et de l'ADN. Les complexes résultant ont donc des combinaisons enzymatiques spécifiques ciblant la chromatine (Silverstein and Ekwall, 2005).

Au sein de ces complexes, SIN3 possède un rôle de plate-forme, HDAC1 et 2 une activité enzymatique de désacétylation des histones, et les autres partenaires sont impliqués dans la stabilisation des interactions à l'intérieur du complexe et entre les « cœurs » d'histones et le complexe. En effet, les protéines RbAp (Retinoblastoma-Associated protein), par leur domaine WD, aident à stabiliser physiquement le contact entre le complexe et le nucléosome. Les protéines SAP (Sin3-Associated Protein), quant à elles, stabilisent l'interaction du complexe avec les HDAC (Silverstein and Ekwall, 2005).

SIN3 méthyle les histones via son interaction avec ESET (ERG-associated protein with SET domain), une méthyl-transférerase spécifique de l'histone H3 (Silverstein and Ekwall, 2005).

Indépendamment de son rôle dans la régulation transcriptionnelle, le complexe Sin3 possède un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome (Silverstein and Ekwall, 2005).

Une étude montre que, lors de la différenciation, les gènes liés par le complexe Sin3 en coopération avec la protéine E2F4 sont ceux impliqués dans le cycle cellulaire. Par contre, ceux liés par Sin3 « seul » sont impliqués dans des processus de synthèse des protéines mitochondriales et cellulaires, de différenciation, de développement et de métabolisme lipidique (van Oevelen et al., 2008).

Les complexes Sin3 comprenant SIN3, HDAC et RBP2 (une déméthylase de H3K4Me3) sont recrutés par E2F4, résultant en des modifications hautement spécifiques des cibles

nucléosomales immédiatement en aval du site d'initiation de la transcription. Sin3 joue donc un rôle essentiel dans la formation de l'hétérochromatine et la répression permanente des gènes dans les cellules différenciées en se liant et s'étalant le long du promoteur. Ce complexe localise ainsi la désacétylation et la déméthylation des nucléosomes proximaux menant à leur repositionnement, sur un sous-ensemble de gènes régulés par E2F4 (van Oevelen et al., 2008).

- PcG

Les complexes protéiques PcG (Polycomb Group) et TrxG (Trithorax Group) ont été découverts chez la Drosophile en tant que répresseurs et activateurs transcriptionnels des gènes *Hox*, spécifiant l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur des animaux segmentés en maintenant l'expression de ces gènes (Cao and Zhang, 2004) (Schuettengruber et al., 2007).

PcG regroupe trois classes de complexes. Le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), qualifié de « complexe d'initiation », est composé de E(Z) (Enhancer of Zeste), ESC (Extra Sex Comb), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12) et Nurf-55 chez la drosophile, ce qui équivaut chez l'Homme à EZH2, EED, SUZ12 et RbAp46/48. E(Z) possède un domaine SET responsable du dépôt de la marque répressive H3K27Me3 (Cao and Zhang, 2004) (Schuettengruber et al., 2007). Un complexe PRC2 plus grand est décrit spécifiquement aux gènes cibles, il contient PCL (Polycomb-Like) dont les homologues chez les mammifères sont PHF1 (PHD Finger protein 1) et hPLC3 (human Polycomb-like 3). En absence de ces protéines la triméthylation H3K27 serait altérée mais pas sa diméthylation (Schwartz and Pirrotta, 2008).

Le complexe PRC1, qualifié de « complexe de maintenance », est composé de Pc (Polycomb), Ph (Polyhomeotic), Psc (Posterior sex combs) et dRING. La marque H3K27Me3, déposée par le complexe PRC2, est reconnue par le chromodomaine de Pc. La protéine dRING possède quand à elle une activité E3 Ubiquitine ligase, décrite sur la Lysine 119 de l'histone H2A et impliquée dans la répression mise en place par ce complexe (Schuettengruber et al., 2007) (Mateos-Langerak and Cavalli, 2008).

Le troisième type de complexe est PhoRC composé de Pho (Pleiohomeotic) et dsfmbt (*scm*-related gene containing four malignant brain tumor (MBT) domains). Contrairement à PRC1 et PRC2, il peut lier l'ADN. Via ses domaines MBT, dsfmbt lie spécifiquement H3K9 et H4K20 mono et diméthylés. Pho interagit avec PRC2 et, grâce à ses doigts de zinc, induit son recrutement aux PREs. Les PREs (Polycomb Responsive Elements) n'ont été jusqu'alors décrits que chez la Drosophile. Le mécanisme de recrutement de ces complexes à l'ADN chez

les mammifères n'est pas encore défini (Schuettengruber et al., 2007) (Mateos-Langerak and Cavalli, 2008). L'homologue mammifère de Pho est YY1 (Yin Yang 1), par contre il n'est pas encore décrit d'homologue de dsfmbt (Schwartz and Pirrotta, 2008).

Un scénario plausible expliquant le fonctionnement de ces complexes serait un processus séquentiel initié par la liaison de PhoRC et/ou de PRC2, seul(s) ou en coopération avec d'autres facteurs chromatinien(s), à des séquences spécifiques d'ADN. Les protéines PcG pourraient établir la marque H3K27Me3 par un mécanisme auto-entretenu impliquant la liaison aux Lysines méthylées et l'activité méthyl-transférase de E(Z) (Mateos-Langerak and Cavalli, 2008).

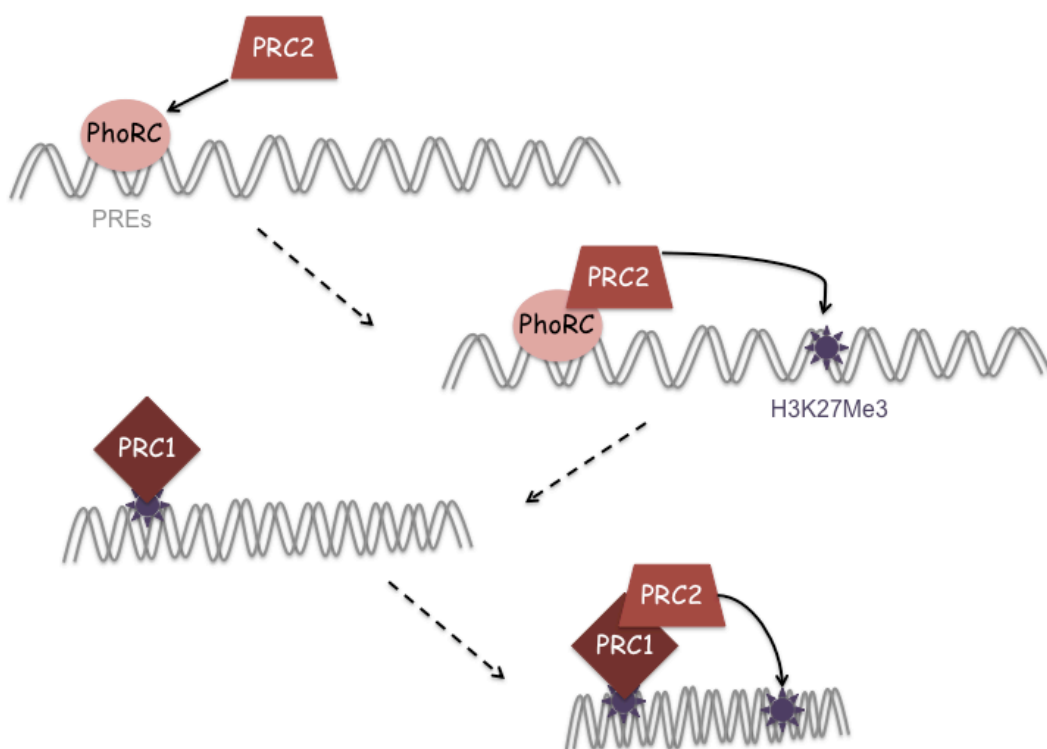


Figure 3 : Répression transcriptionnelle mise en place par les complexes PcG.

Cette modification d'histones associée aux complexes PcG, longtemps considérée comme étant une marque relativement stable, peut avoir une évolution rapide dans certaines conditions. Les domaines JmjC (Jumonji) des protéines UTX (Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene on X chromosome) et JMJD3 sont des déméthylases spécifiques de H3K27 (Schwartz and Pirrotta, 2008).

L'inhibition de la transcription par les PcG est liée aux changements de structure de la fibre chromatinienne. PRC1 inhibe le remodelage des nucléosomes dépendant de l'ATP lié à la transcription, il réarrange la fibre en collier de perles en structure plus compacte (Mateos-

Langerak and Cavalli, 2008). De plus, un lien a été décrit entre les complexes PcG et la méthylation de l'ADN car EZH2 peut recruter directement les DNMTs aux gènes cibles (Schuettengruber et al., 2007).

L'effet répressif des PREs n'est pas limité aux gènes de la même molécule d'ADN. Ils peuvent en effet exercer leur influence sur la chromatine voisine, qu'elle fasse partie de la même fibre ou non. Ce phénomène est nommé PSS (Pairing-Sensitive Silencing) ou transvection. Il a été décrit dans le cas de chromosomes homologues associés en paires (fréquent chez la Drosophile) où les allèles homologues peuvent s'influencer l'un l'autre (Mateos-Langerak and Cavalli, 2008).

- Les « super complexes »

L'homologue mammifère de la protéine Trithorax de Drosophile est ALL-1 (ou MLL, HRX, HTRX). Les protéines associées à cette protéine peuvent être classées en huit groupes : les composants du cœur du complexe SWI/SNF (BRM, BAF170-155-47), les composants du complexe NuRD (Mi2, MTA1-L1, HDAC1-2, RbAp46-48, MBD3), les composants du complexe Sin3 (SIN3A, SAP30-18, HDAC1-2, RbAp46-48), l'homologue de ISWI (hSNF2H), les composants du complexe TFIID (TAFII250-80-31-20, TBP), les homologues du complexe Set1 de levure de méthylation H3K4 (RbBP5, WDRP5), les protéines impliquées dans le traitement des ARN, et enfin la protéine de transport nucléo-cytoplasmique et d'assemblage du fuseau mitotique Ran (Nakamura et al., 2002).

Ce super complexe ALL-1 est l'un des conglomérats protéiques impliqués dans la transcription les plus importants. Il comporte des activités de remodelage de la chromatine, de désacétylation et d'acétylation des histones, et de méthylation de la forme non modifiée de H3K4. Il a notamment été décrit lié au promoteur de *Hoxa9* (Nakamura et al., 2002).

- Les corépresseurs : l'exemple de CtBP

La protéine CtBP (C-terminal Binding Protein) a été découverte via son interaction avec la protéine E1A de l'adénovirus. Il existe deux protéines chez l'Homme et la souris : CtBP1 et 2 qui présentent 78% d'identité en acides-aminés et fonctionnent de manière interchangeable (Bergman and Blaydes, 2006).

Ces corépresseurs interagissent avec plus d'une trentaine de régulateurs de la transcription, la plupart du temps par l'intermédiaire d'un motif PxDLS au sein de ces facteurs. Ils sont responsables du recrutement de complexes corépresseurs contenant des activités de désacétylation, de méthylation et de déméthylation des histones, mais sont également capables de réprimer la transcription de manière indépendante des HDACs. La marque répressive associée à CtBP est la mono ou di méthylation de H3K9. CtBP a été décrite recrutant les protéines Polycomb à l'ADN et prévenant l'interaction des protéines acétylant les histones p300, CBP et pCAF avec la chromatine (Bergman and Blaydes, 2006) (Chinnadurai, 2007).

L'invalidation fonctionnelle de CtBP révèle des rôles clés dans la différenciation, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose (Bergman and Blaydes, 2006).

CtBP est importante pour la transition épithélio-mésenchymateuse, une étape qui contribue à la propriété maligne des cellules tumorales due à la perte d'adhésion intercellulaire, l'acquisition de phénotype invasif et la résistance à l'apoptose. Cette protéine est en effet un corépresseur de plusieurs gènes épithéliaux et pro-apoptotiques (Chinnadurai, 2009).

Les protéines CtBP présentent un domaine central d'homologie avec les déshydrogénases dépendantes du NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). C'est un domaine d'homo et d'hétéro oligomérisation et la dimérisation via ce domaine est fortement stimulée par le NADH, molécule réductrice dont la principale fonction est le transfert d'électron (Bergman and Blaydes, 2006). CtBP possède donc la capacité unique de perception des taux de NADH libre au sein de la cellule et peut transmettre cette information aux complexes qui régulent l'expression de nombreux gènes.

Les tumeurs hautement agressives qui croissent rapidement sont exposées à l'hypoxie ; il est proposé que celle-ci soit l'événement initiateur des métastases. De plus, la perte de la E-cadhérine est un événement central de ces métastases. La E-cadhérine est une protéine membranaire dépendante du calcium, requise pour la formation de jonctions adhérentes entre les cellules.

L'hypoxie augmente le taux de NADH libre au sein de la cellule, entraînant le recrutement de CtBP à la région proximale du promoteur de la *E-cadhérine* et la répression de ce gène (Zhang et al., 2006).

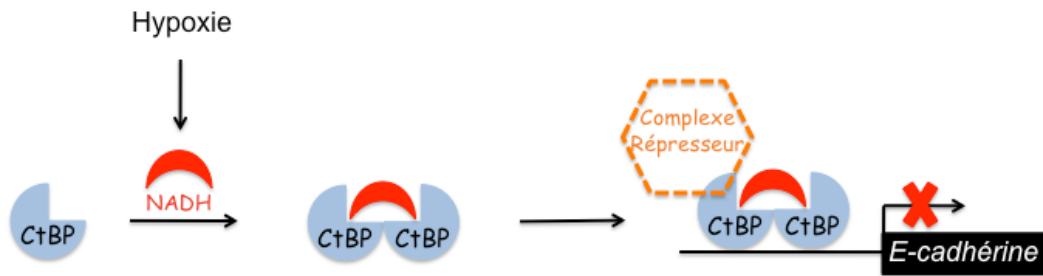


Figure 4 : Répression transcriptionnelle mise en place par CtBP en réponse à l'hypoxie.

2) Les complexes à activité ATPase

- SWI/SNF
 - Composition

Il existe différents complexes SWI/SNF, composés de 9 à 11 protéines, contenant un cœur invariable et des sous-unités variables. Cette pluralité mène à des rôles variés ; en effet ces complexes sont soit activateurs soit répresseurs de la transcription.

Il n'existe pas de complexe contenant toutes les sous-unités, et certaines sous-unités chez les mammifères n'ont pas d'orthologues chez les invertébrés. Trois types principaux de complexes sont décrits : BRM/BAF, BRG1/BAF et PBAF (ce qui différencie principalement ces deux derniers complexes est la présence soit de BAF250 pour le premier, soit de BAF180 pour le second). Plusieurs autres complexes ont été identifiés contenant BRG1 et certaines sous-unités SWI/SNF tels que WINAC ou NUMAC (Reisman et al., 2009).

Ces complexes SWI/SNF sont tous composés selon le même modèle : une ATPase BRM ou BRG1 et leurs protéines associées BAF (BRM- or BRG1-Associated Factors). Les complexes les plus décrits sont ceux contenant la protéine BAF250. Chez les mammifères il existe deux protéines BAF250 = ARID1A et ARID1B qui sont elles aussi mutuellement exclusives au sein des SWI/SNF. Au vu des différents membres mutuellement exclusifs, quatre complexes différents, représentés sur la figure suivante, peuvent être pris en compte dans l'étude de la fonctionnalité de SWI/SNF. Les composants majeurs de ces complexes sont décrits brièvement ci-dessous.

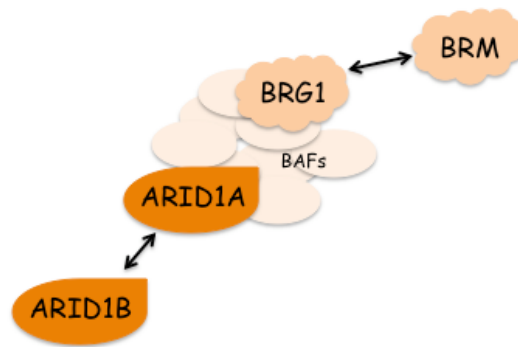


Figure 5 : Complexes SWI/SNF les plus fréquemment décrits.

Les ATPases mutuellement exclusives BRM (Brahma), codée par *SMARCA2*, et BRG1 (Brahma Related Gene 1), codée par *SMARCA4*, présentent 75% d'identité de séquence en acides aminés. Les 60 premiers acides aminés divergent : BRM possède une expansion polyQ. Ces protéines possèdent six domaines conservés : le domaine QLQ qui est impliqué dans l'interaction entre les protéines ; un domaine riche en Proline ; HSA (Small Helicase/SANT-Associated domain) qui est prédit liant l'ADN et est associé à des hélicases ; le domaine ATPase constitué d'un domaine hélicase et d'une boîte DEAD ; un domaine LxCxE de liaison à Rb et un domaine Bromo de liaison aux histones acétylées (Reisman et al., 2009).



Figure 6 : Représentation schématique des ATPases des complexes SWI/SNF : BRG1 et BRM.

Les souris *Brg1*^{-/-} meurent au cours du développement embryonnaire précoce au stade blastocyste. Les animaux hétérozygotes *Brg1*^{+/-} développent des tumeurs avec une faible incidence au sein desquelles il n'est pas observée de perte d'hétérozygotie (LOH) (Roberts and Orkin, 2004).

Les souris *Brm*^{-/-}, quant à elles, naissent, mais sont 15% plus grosses que les sauvages (Roberts and Orkin, 2004).

Le problème lié à l'étude par inactivation de ces ATPases est qu'elles peuvent se compenser l'une et l'autre dans certaines circonstances.

La perte d'activité de SWI/SNF par extinction de BRG1 et BRM induit une phénocopie de perte de fonction de p53 (Reisman et al., 2009).

Les protéines ARID (AT-Rich DNA Interacting Domain, = BAF250) sont elles aussi mutuellement exclusives au sein des complexes SWI/SNF. Elles contiennent des domaines EHD1 et EHD2 (Eps15 Homology Domain) en C-terminal impliqués dans la liaison protéique. *ARID1A* est situé en 1p36.11, une région fréquemment délétée dans les cancers humains et qui pourrait être impliquée dans le développement cancéreux (Reisman et al., 2009).

BAF47 (= SNF5 = INI1) est codée par un gène suppresseur de tumeurs. Son invalidation par recombinaison homologue chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce tandis que 15 à 20% des souris hétérozygotes pour ce gène développent des tumeurs à 20 mois, au sein desquelles est observée une perte d'hétérozygotie (LOH) (Roberts and Orkin, 2004).

BAF180, qui fait partie du complexe PBAF, est codé par le gène *PRBM1* au site 3p21 qui est fréquemment perdu au sein des tumeurs humaines hétérozygotes. Cette protéine contient un domaine Bromo (Reisman et al., 2009).

BAF200 = ARID2 appartient également au complexe PBAF. En plus du domaine ARID, elle contient de multiples domaines LxxLL d'interaction protéique entre les cofacteurs et les récepteurs aux hormones nucléaires, ainsi qu'une région riche en Proline et Glutamine et deux doigts de zinc C_2H_2 . BAF200 et BAF180 sont requises pour les propriétés de transactivation du complexe PBAF (Reisman et al., 2009).

Les complexes SWI/SNF contiennent également les protéines de la famille BAF60 (A, B et C), BAF57, BAF155, BAF170 (qui présente 75% d'homologie nucléotidique avec BAF155), les protéines apparentées à l'actine BAF53A et B et l'actine β (Reisman et al., 2009).

- Fonctionnement

Le complexe SWI/SNF a joué un rôle pionnier dans la compréhension des mécanismes de remodelage de la chromatine utilisant l'énergie de l'ATP. Seulement quatre de ses sous-unités sont indispensables à l'activité *in vitro* : les ATPases BRM ou BRG1, BAF47, BAF155 et

BAF170. Les autres sous-unités semblent permettre d'assurer la spécificité du complexe grâce à des interactions protéiques (Roberts and Orkin, 2004) (Reisman et al., 2009).

Les sous-unités catalytiques contiennent deux domaines RecA-like : 1A qui contient le motif DExx et 2A. La fente formée par ces domaines accueille une molécule d'ATP. Les changements du cycle de l'ATP conduit des mouvements qui sont amplifiés par des domaines accessoires situés en dehors de 1A et 2A : 1B et 2B. Ces quatre domaines forment la région H (Helicase-like). L'activité ATPase de ces sous-unités catalytiques est stimulée par liaison au substrat (nucléosome ou ADN libre) (Racki and Narlikar, 2008).

Grâce à l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP, ces complexes SWI/SNF peuvent introduire des changements dans la superhélicité de l'ADN, générer des nucléosomes contenant des boucles stables d'ADN, transférer un octamère d'histones à un ADN accepteur et inter-changer les dimères H2A/H2B entre les nucléosomes (Racki and Narlikar, 2008). Cette capacité à générer divers produits conforte le rôle biologique de ce type de complexe qui est d'empêcher localement les interactions entre les histones et l'ADN au promoteur de gènes cibles. Il régulerait ainsi l'accessibilité de régions spécifiques de l'ADN à la machinerie basale de transcription.

Ces complexes sont finement régulés. Par exemple, lorsque les cellules entrent en mitose, ils sont exclus de la chromatine et leur activité de remodelage est inactivée par phosphorylation (Kingston and Narlikar, 1999).

- Rôles

5% des gènes de levure sont régulés par les complexes SWI/SNF au niveau transcriptionnel ; ils sont dispersés dans tout le génome. Ces complexes réprimerait plus de gènes qu'ils n'en activeraient (Roberts and Orkin, 2004).

Au vu du rôle transcriptionnel prépondérant de ces complexes il n'est pas étonnant qu'un grand nombre de protéines, dont plusieurs facteurs de transcription, aient été liés à SWI/SNF. Il s'agit, entre autres, de AP-1 (Activator Protein 1), EKLF (Erythroid Kruppel-Like Factor), des récepteurs aux hormones (stéroïdes, œstrogènes, androgènes) ainsi que la E-cadhérine et différentes intégrines.

Ces complexes sont également liés à d'autres processus clés incluant la synthèse de l'ADN, l'intégration et l'expression virale et la régulation des gènes mitotiques. De plus, ils peuvent moduler l'épissage alternatif en « bloquant la route » à l'élongation transcriptionnelle. (Roberts and Orkin, 2004) (Reisman et al., 2009). Certains rôles de ces complexes sont

déduits de ceux associés à l'un de ses membres, dont certains exemples sont décrits ci-après.

BRG1 et BRM contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire. Elles sont requises pour l'activité de certains récepteurs nucléaires et ont également un rôle dans le système immunitaire (Reisman et al., 2009).

La forme prédominante de BRCA1 (Breast Cancer susceptibility gene 1) se trouve au sein d'un complexe multi protéique qui contient SWI/SNF. BRCA1 interagit directement avec BRG1, ce qui est nécessaire à l'initiation de la transcription dépendante de p53. Ces deux protéines se lient à FANCA qui appartient au complexe « Fanconi anaemia » impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans sa réparation (Roberts and Orkin, 2004).

BAF60C est essentielle pour l'établissement de l'asymétrie droite gauche (Reisman et al., 2009). Quant à BAF53A, elle est associée aux chromosomes mitotiques et contribue aux interactions de maillage interne de la fibre chromatique (Reisman et al., 2009).

Certaines protéines de ces complexes ont également la capacité de se réguler entre elles. En effet, BAF155 stabilise BAF47, BRG1 et BAF60A pour atténuer leur dégradation protéasomale, et BAF170 régule le turnover de BAF57 (Reisman et al., 2009).

Les fibroblastes embryonnaires *Brm*^{-/-} ne s'arrêtent pas en G0/G1, laissant supposer un rôle de la protéine dans les régulations du cycle cellulaire et de la croissance (Roberts and Orkin, 2004).

La protéine Rb (Rétinoblastome) coopère par interaction directe avec BRM et BRG1 pour réprimer l'activité de E2F1. Le complexe répresseur Rb contient des HDACs et le complexe SWI/SNF qui, ensemble, répriment la transcription des *Cyclines E* et *A*, causant l'arrêt du cycle en phase G1. La phosphorylation de Rb par le dimère Cycline D-CDK4 promeut la progression du cycle cellulaire en disloquant l'association de Rb avec les HDACs, ce qui permet à E2F de transcrire la *Cycline E*, menant à la progression en phase S. Par contre, le complexe Rb-SWI/SNF persiste et est suffisant pour maintenir la répression de la *Cycline A* et de *CDC2*, inhibant ainsi la sortie de la phase S (Roberts and Orkin, 2004).

Les complexes contenant les protéines mutuellement exclusives ARID1A ou 1B ont été décrits, et l'utilisation de siRNA ciblant l'une ou l'autre des protéines montre qu'ils auraient des rôles différents. En effet, alors que ceux contenant ARID1A ont une fonction antiproliférative, ceux décrits avec ARID1B présentent une fonction pro proliférative (Nagl et al., 2007).

ARID1B est toujours présente aux promoteurs de *c-Myc*, *CDC2*, *Cyclines E* et *A*, tandis que ARID1A n'est présente que lors de leur répression. Ces gènes sont régulés par les facteurs de transcription spécifiques du cycle cellulaire, E2F. E2F1 et 3 sont activateurs et E2F4 et 5 sont répresseurs. E2F1 interagit avec ARID1B et E2F4 et E2F5 avec les deux. L'étape limitante de l'activation du cycle cellulaire dans les cellules délétées en ARID1B se trouve en amont de E2F1 et affecte l'expression de *c-Myc*. Les deux types de complexes ARID1A et 1B présentent une activité HDAC, par contre seule ARID1B possède une activité HAT. Les activités HDAC seraient différentes puisque HDAC1 et 2, qui appartiennent au complexe Sin3, interagissent avec ARID1A, et HDAC3 interagit avec ARID1B (Nagl et al., 2007).

Les deux ATPases alternatives des complexes SWI/SNF ont également été associées à des complexes ayant des rôles différents. En effet, au cours de l'ostéogenèse, la progression vers la différenciation terminale est dépendante de BRG1, tandis que BRM restreint cette différenciation.

Différents gènes impliqués dans la différenciation osseuse sont des cibles de BRM, dont *l'ostéocalcine*. Lorsque les ostéoblastes ne sont pas induits dans la différenciation, BRG1 et BRM sont présentes en même temps au promoteur de ce gène. Le promoteur serait donc prêt à l'expression mais celle-ci serait empêchée par la présence des complexes BRM-HDAC1. Par contre, lorsque ces cellules sont induites, seule BRG1 est détectable.

Les sous-unités ARID sont également recrutées différemment : ARID1A est présente lorsque le gène est réprimé tandis que ARID1B l'est lorsqu'il est actif.

Ceci implique donc que le complexe BRG1 change de configuration entre ARID1A et 1B. Un complexe contenant BRG1 est clairement requis pour l'activation, tandis que la diminution d'expression de ARID1A ou 1B ne change pas le phénotype de minéralisation.

Il est également observé une apparition de la marque activatrice H3K4 triméthylée, qui corrèle avec la dissociation des complexes BRM (Flowers et al., 2009).

Il se dessinerait donc un modèle général selon lequel le complexe contenant BRM et ARID1A serait plutôt impliqué dans la répression, celui contenant BRG1 et ARID1B dans l'activation, tandis que les autres seraient plus variables dans leur activité (Flowers et al., 2009).

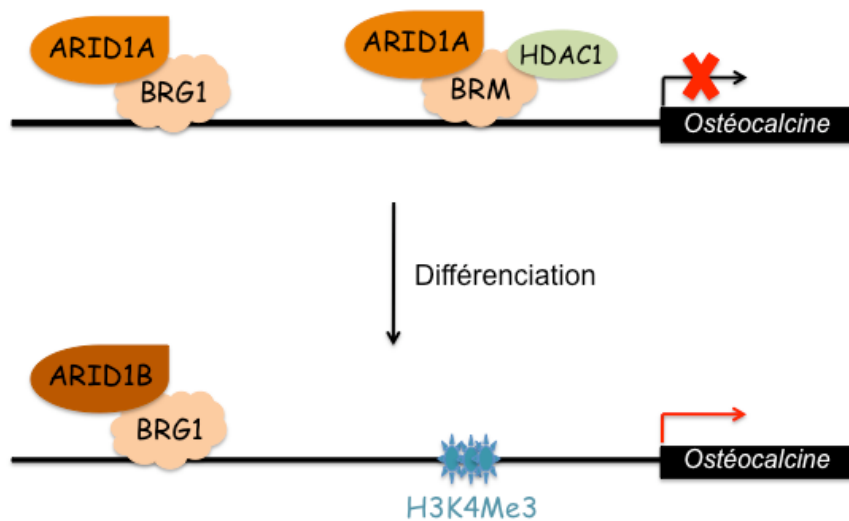


Figure 7 : Rôle des différents complexes SWI/SNF au cours de l'ostéogenèse.

- Antagonisme SWI/SNF – ISWI

Le gène de levure *RNR3* (*RiboNucleotide Reductase 3*) est devenu un modèle pour disséquer les fonctions des facteurs remodelant la chromatine. Les nucléosomes sont positionnés le long du gène entier lorsque celui-ci est réprimé. L'activation de la transcription est accompagnée par un remodelage extensif de la chromatine et l'expulsion des nucléosomes. Le taux d'activité du promoteur de ce gène est régulé par les actions opposées de deux complexes remodelant la chromatine : ISWI le réprime et SWI/SNF l'active (Tomar et al., 2009).

Une étude récente montre que dans des levures délétées de ISW2 les nucléosomes de ce gène adoptent un positionnement différent, tandis que dans celles délétées de SWI/SNF il n'y a pas d'ablation des nucléosomes du promoteur dans les conditions d'activation du gène. Les queues d'histones sont impliquées dans le repliement des nucléosomes en structure plus compactée et il a été décrit que celle de l'histone H4 est requise pour le fonctionnement de ISW2. La présence du complexe ISW2 ainsi que la mutation de la queue de l'histone H4 sont antagonistes au recrutement de SWI/SNF au gène *RNR3*. ISW2 supprimerait donc le recrutement de SWI/SNF au gène *RNR3* en établissant une structure chromatique répressive, spécifiquement par repositionnement des nucléosomes (Tomar et al., 2009).

- NuRD

Le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) est jusqu'aujourd'hui le seul complexe comportant des activités couplées de remodelage des nucléosomes dépendant de l'ATP et de désacétylation des histones.

Ce complexe possède lui aussi des protéines formant un cœur invariant et des unités variables.

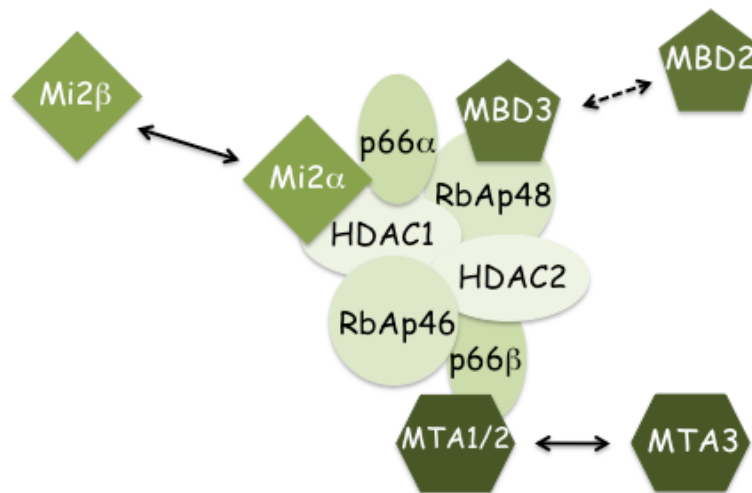


Figure 8 : Représentation schématique du complexe NuRD.

- Mi2

Les protéines Mi2 α et β sont les ATPase mutuellement exclusives du complexe NuRD. Elles contiennent deux domaines PHD, deux chromodomaines et un domaine hélicase/ATPase de type SWI/SNF (Zhang et al., 1998) (Xue et al., 1998).

Chez l'Homme, l'activité ATPase de Mi2 est dépendante de l'ADN et est stimulée par les nucléosomes (Zhang et al., 1998) (Xue et al., 1998) (Wang and Zhang, 2001). A l'inverse, chez la Drosophile, l'activité de Mi2 n'est pas stimulée par l'ADN natif, contrairement à l'activité ATPase du complexe ISWI, ce qui présage des fonctions différentes. Ces deux complexes déplacent d'ailleurs les nucléosomes en direction opposée ; les chromodomaines de Mi2 sont nécessaires à cette activité (Brehm et al., 2000) (Bouazoune et al., 2002). Chez le Xénope, la mobilisation du nucléosome par Mi2 s'effectue vers le centre du fragment de chromatine et nécessite également l'énergie de l'ATP (Guschin et al., 2000).

Le domaine répresseur KRAB (Krüppel Associated Box), contenu par diverses protéines, recrute ses partenaires par l'intermédiaire de KAP1 (KRAB-Associated Protein 1) qui interagit directement avec lui et joue donc le rôle de plate-forme. KAP1, par son interaction directe avec Mi2, permet le recrutement du complexe NuRD aux protéines à domaine KRAB (Schultz et al., 2001). La protéine Ikaros interagit également avec ce complexe via Mi2 (Hong et al., 2005).

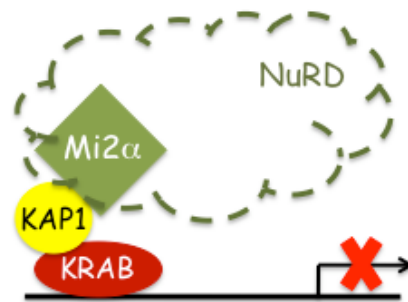


Figure 9 : Recrutement de NuRD par le domaine KRAB.

Chez la Drosophile, dMi2 a récemment été découverte faisant partie d'un nouveau complexe en association avec dMEP-1, le complexe dMec (dMEP-1 complex). Contrairement à dNuRD, il possède une activité de remodelage des nucléosomes mais pas de désacétylation des histones. Il est par contre beaucoup plus présent dans les embryons et est responsable de la répression des gènes proneuronaux (Kunert et al., 2009).

- HDAC1 et 2

Les protéines HDAC1 et 2 sont responsables de la seconde fonction du complexe NuRD, la désacétylation des histones. Cette fonction est liée à la précédente de manière non réciproque. En effet, l'efficacité de désacétylation du complexe NuRD diminue en absence d'ATP chez le Xénope (Guschin et al., 2000) et chez l'Homme l'ATP stimule l'activité désacétylase sur les histones des nucléosomes (Xue et al., 1998). Par contre et à l'inverse, l'activité HDAC n'est pas nécessaire au remodelage des nucléosomes (Zhang et al., 1998) (Xue et al., 1998).

- RbAp46 et 48

Les protéines RbAp46 et 48 (Retinoblastoma Associated protein) sont les sous-unités structurales du complexe NuRD. Grâce à leurs domaines WD elles agissent comme des surfaces d'interaction protéique. Elles font également partie de plusieurs autres complexes

au sein desquels elles interagissent directement avec le cœur d'histones (Denslow and Wade, 2007).

- P66 α et β

Les protéines p66 α et β interagissent avec différents membres du complexe NuRD (MBD, MTA, RbAp) via leur région CR1. Leur région CR2 est quant à elle nécessaire à l'interaction avec les queues d'histones, laissant présager un rôle de recrutement du complexe NuRD à la chromatine (Gong et al., 2006).

Ces protéines sont SUMOylées et cette modification est nécessaire à l'interaction de p66 α avec HDAC1 et de p66 β avec RbAp46 (Gong et al., 2006). Cette étude permet de mettre en évidence une régulation supplémentaire de la fonction des différents complexes via les modifications post-traductionnelles des différents partenaires.

- MBD2 et 3

Les protéines MBD2 et 3 (Methyl CpG Binding Protein) doivent avoir des fonctions différentes puisque leur invalidation respective par recombinaison homologue chez la souris entraîne une létalité embryonnaire dans le cas de MBD3 tandis que pour MBD2 les souris sont viables et les défauts relativement imperceptibles (Le Guezennec et al., 2006).

Grâce à son domaine MBD, MBD2 peut lier l'ADN méthylé. MBD3, quant à elle, a perdu cette propriété au cours de l'évolution par substitution d'un acide aminé critique au sein de ce domaine (Bowen et al., 2004) (Denslow and Wade, 2007).

Le fait que ses deux protéines fassent partie du complexe NuRD est controversé. En ce qui concerne MBD3 son appartenance est bien établie, d'autant plus qu'elle permet maintenant de discriminer les complexes NuRD et NODE (Nanog and Oct4-associated Deacetylase) (Liang et al., 2008). Par contre, dans le cas de MBD2, il pourrait s'agir d'un recrutement de NuRD par cette protéine afin de mettre en place son activité de répression transcriptionnelle (Zhang et al., 1999) (Denslow and Wade, 2007) ; bien qu'une étude en particulier la place clairement dans des complexes distincts de ceux contenant MBD3 (Le Guezennec et al., 2006).

La protéine MBD3 est essentielle au complexe puisque son absence entraîne le désassemblage de celui-ci et la diminution concomitante des taux de certaines autres sous-unités telles que MTA2 et HDAC1 (Morey et al., 2008). Elle interagit d'ailleurs directement avec ces deux protéines, permettant l'association de MTA2 avec le cœur du complexe HDAC/RbAp (Zhang et al., 1999).

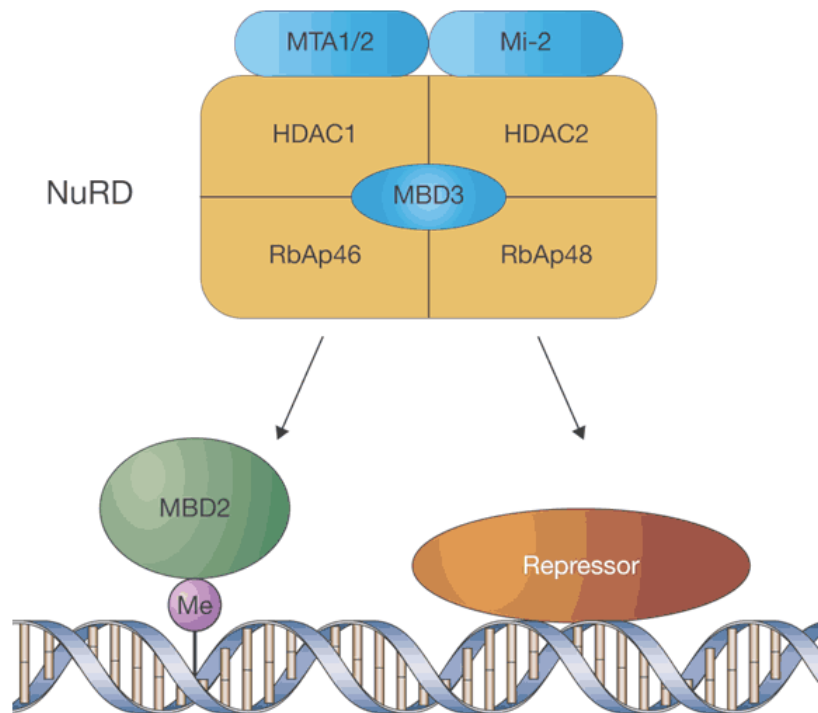


Figure 10 : Le complexe NuRD interagit avec des répresseurs et/ou est recruté par MBD2 à l'ADN méthylé (Crook et al., 2006).

- MTA1, 2 et 3

Bien que n'interagissant pas avec les mêmes partenaires au sein de NuRD, plusieurs répresseurs transcriptionnels recrutent ce complexe via un même motif dans leur partie N-terminale : MSRRKQxxP. C'est par exemple le cas pour FOG-1, EBFAZ, Evi3, BCL11B et SALL-1 (Hong et al., 2005) (Roche et al., 2008).

L'association entre NuRD et FOG-1 (Friend Of GATA) se ferait par deux familles distinctes : MTA1-2 et RbAp46-48, tandis que celle avec FOG-2 uniquement par MTA1 et 2, celle avec p53 par MTA2, et celle avec BCL6 par MTA3 (Hong et al., 2005) (Roche et al., 2008).

Le caractère fondamental de ce motif de recrutement de NuRD a été établi récemment : sa perte au sein du répresseur transcriptionnel Zfhx1b (Zinc finger homeobox 1b) est impliquée dans le syndrome de Mowat-Wilson (MWS) responsable, entre autre, de retard mental sévère et de dysmorphie faciale (Verstappen et al., 2008).

Les fonctions fondamentales des membres de la famille MTA (Metastasis-Associated) semblent être exercées à travers le complexe NuRD. Ces protéines forment des complexes NuRD distincts qui ciblent différents promoteurs et définissent donc des formes

fonctionnelles spécialisées (Bowen et al., 2004) (Manavathi and Kumar, 2007) (Toh and Nicolson, 2009).

Le premier membre de cette famille à avoir été identifié est MTA1, par association de son expression avec le phénotype métastatique de plusieurs types tumoraux (Toh et al., 1994) (Toh et al., 1999) (Hofer et al., 2004). Cette protéine est donc fortement impliquée dans les cancers.

MTA1 a un rôle prépondérant dans le cancer du sein. D'une part, grâce à son interaction avec HDAC2, l'un des partenaires du complexe NuRD, elle réprime la transcription du premier gène de susceptibilité aux cancers du sein et de l'ovaire : le gène suppresseur de tumeurs *BRCA1* (*Breast Cancer susceptibility gene 1*) (Molli et al., 2008).

De plus, MTA1, via NuRD, réprime la transcription mise en place par les récepteurs aux œstrogènes (ER pour œstrogen receptor). Les cellules qui expriment MTA1 peuvent donc avoir les gènes de réponse à ER affectés et acquérir un phénotype plus invasif ; cette protéine est d'ailleurs exprimée lors des stades de développement de la glande mammaire ainsi que pendant la lactation, lorsque le taux de ER est plus faible (Mazumdar et al., 2001). Cet effet passe notamment par l'interaction entre MTA1 et HSF1 (Heat Shock Factor 1), qui peut être régulée par les conditions externes puisque leur colocalisation est augmentée après choc thermique (Khaleque et al., 2008).

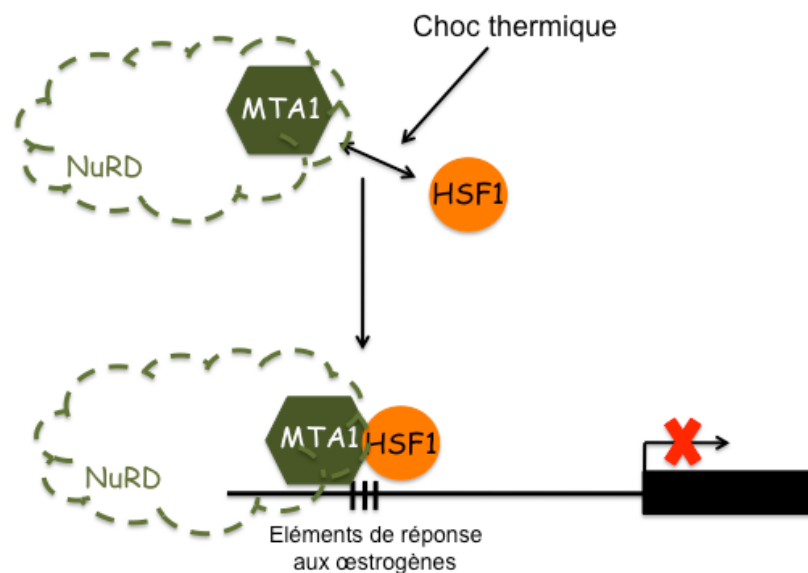


Figure 11 : Répression de la transcription mise en place par les récepteurs aux œstrogènes par MTA1.

Il existe également un effet activateur de MTA1 en réponse aux œstrogènes, indépendamment du complexe NuRD mais via l'interaction avec l'acétylase p300. Dans ce cas, MTA1, en association avec ER α , coactive le gène *BCAS3* (*Breast Carcinoma Amplified Sequence 3*) dont l'expression est augmentée dans les lignées de cancer du sein (Gururaj et al., 2006).

Des souris transgéniques exprimant *MTA1* de manière plus importante, grâce au contrôle de ce gène par un promoteur exprimé dans les glandes mammaires et salivaires lors de la puberté, présentent un développement de la glande mammaire inapproprié avec une différenciation précoce, une perte de la nécessité de stimulation hormonale et une tumorigenèse augmentée (Bagheri-Yarmand et al., 2004).

Le même type d'étude, à l'aide d'un promoteur exprimé dans les tissus lymphoïdes, met en évidence l'implication de MTA1 dans les lymphomes spontanés des cellules B dont l'incidence augmente avec l'âge (50% à 30 mois) ; cet effet passe notamment par l'activation de *Pax5* par liaison de MTA1 à son « enhancer ». Pax5 est un facteur de transcription spécifique des cellules B ayant des fonctions dans le développement précoce ainsi que dans la différenciation tardive (Bagheri-Yarmand et al., 2007) (Balasenthil et al., 2007).

A l'inverse, la diminution d'expression de *MTA1* supprime l'établissement et la croissance tumorale *in vivo* (Qian et al., 2007).

Le rôle joué par MTA1 dans la transformation est en partie dû à l'oncoprotéine c-MYC qui augmente sa transcription donc son expression (Zhang et al., 2005).

Les conditions hypoxiques dans les tumeurs à croissance rapide entraînent les cellules malignes à former des tumeurs vasculaires solides hypoxiques qui sont agressives et métastatiques. HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) est un régulateur transcriptionnel qui facilite l'adaptation à la faible présence d'oxygène ; il est rapidement dégradé en conditions normoxiques par la voie de l'Ubiquitine. L'expression de HIF-1 α est étroitement liée à la croissance tumorale et aux métastases. La transcription de *MTA1* est augmentée sous hypoxie dans les cellules de cancer du sein. Dans ces conditions, MTA1 inhibe l'acétylation de HIF-1 α via son interaction avec HDAC1, ce qui résulte en la stabilisation de cette protéine (Yoo et al., 2006).

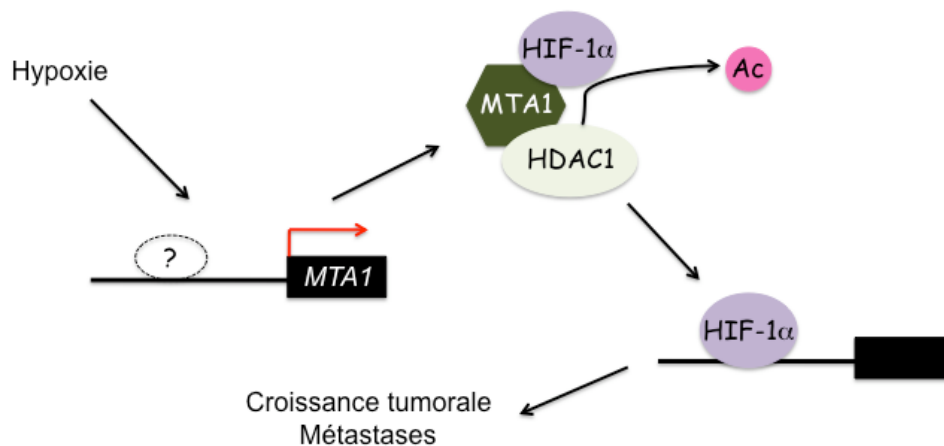


Figure 12 : Effet de l'hypoxie sur MTA1 au sein des cellules cancéreuses de sein.

D'autre part, MTA1 inhibe l'apoptose induite par p53 en inactivant cette dernière par désacétylation (Moon et al., 2007), elle est notamment impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par un stress de chaleur au sein des testicules (Li et al., 2008a). Le complexe NuRD contenant MTA2 désacétyle également p53, augmentant ainsi sa dégradation par MDM2 (Toh and Nicolson, 2009).

MTA1 possède également des fonctions plus étendues : elle est un stimulateur direct de l'expression de la rhodopsine dans l'œil et stimule également la prolifération hépatique *in vivo* permettant ainsi sa régénération (Manavathi et al., 2007a) (Li et al., 2008b).

Les protéines MTA1, 2 et 3 sont codées par trois gènes distincts. MTA1 et 2 sont exprimées de manière ubiquitaire. MTA2 et 3 présentent respectivement 68% et 73% d'identité à MTA1, ces protéines sont plus courtes et la plus forte homologie est concentrée dans la partie N-terminale (Manavathi and Kumar, 2007).

La protéine MTA1 contient plusieurs domaines fonctionnels. En N-terminal se trouve le domaine BAH (Bromo-Adjacent Homology) qui est présent au sein de régulateurs transcriptionnels en tant que module d'interaction protéique impliqué dans la liaison à l'ADN méthylé, la régulation transcriptionnelle et la réplication. Puis vient le domaine ELM2 (Egl-27 and MTA1 homology 2) qui, en association avec le domaine SANT (SWI3/ADA2/NCoR/TFIIIB), pourrait être responsable du recrutement de HDAC1 et 2 et de la méthylase H3K9 G9a. Ce domaine est suivi par une région Leucine Zipper qui se situe en amont du domaine SANT ; ces deux domaines juxtaposés présentent un module fonctionnel pour la formation de complexes protéiques. Enfin suivent un doigt de zinc de type GATA et

en C-terminal un domaine Myb qui est décrit comme servant de signal de localisation nucléaire et/ou de domaine de liaison à l'ADN, puis la protéine de termine par un domaine d'interaction avec les molécules de signalisation SH3 (Src Homology 3) unique à MTA1 (Yao and Yang, 2003) (Manavathi et al., 2007b) (Wang et al., 2008b).

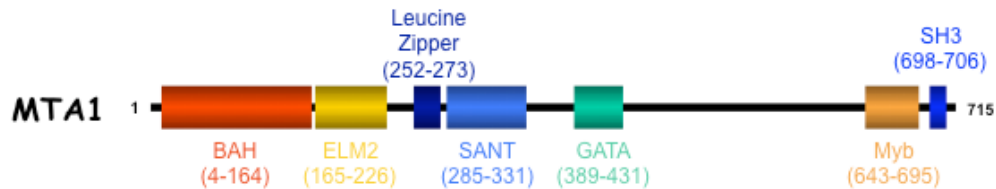


Figure 13 : Représentation de la protéine MTA1 humaine.

MTA2 et 3 sont également en relation avec les œstrogènes puisque la transcription de *MTA3* est dépendante de ER α et que l'expression de MTA2 est corrélée avec des taux élevés de cette dernière. De plus, MTA2 interagit avec ER α et réprime ses fonctions transcriptionnelles en la désacétylant (Singh and Kumar, 2007).

MTA3 est un répresseur de la transcription de *Snail*. Snail est un facteur de transcription impliqué dans la répression du gène *E-cadhérine*, dont la protéine est indispensable à la formation des jonctions adhérentes entre les cellules (Singh and Kumar, 2007). MTA3 fonctionne pour maintenir un statut épithélial normal et différencié dans les cellules de sein, ce qui est en total contraste avec MTA1 ; elle possède également un rôle opposé dans la glande mammaire de souris (Singh and Kumar, 2007) (Toh and Nicolson, 2009).

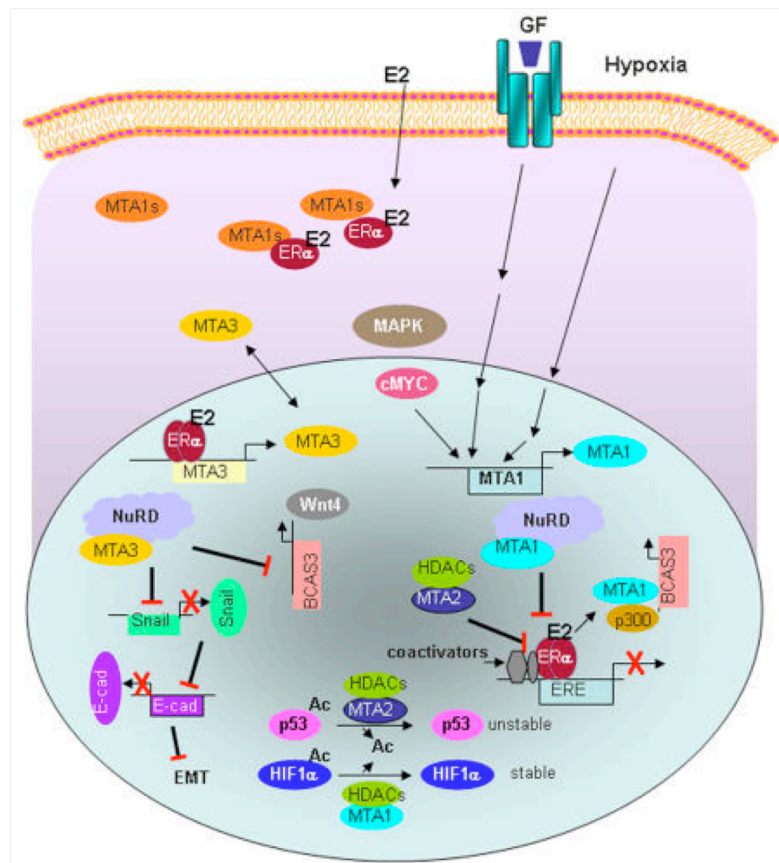


Figure 14 : Rôles joués par les membres de la famille MTA dans la voie de signalisation des récepteurs nucléaires (Manavathi et al., 2007b).

C. Quand la complexité s'en mêle : le cas « simple » de BCL6

1) Du gène à la protéine

Le gène *BCL6* (*B-Cell Lymphoma 6*) est localisé en 3q27. Il a été caractérisé comme un site de translocation dans les lymphomes non Hodgkiniens (NHL) ainsi que dans beaucoup de lymphomes diffus à grandes cellules (DLCL). Le premier exon non codant ainsi que le premier intron sont également la cible d'altérations au sein de lymphomes folliculaires (FL) et DLCL (Hebert et al., 1993) (Allman et al., 1996).

Cette protéine est particulièrement exprimée au sein des centres germinatifs.

BCL6 est exprimé dans les lymphocytes B de la rate et du sang. Ces cellules se trouvent au stade quiescent G0. La stimulation avec un agent mitogène entraîne une diminution

drastique de l'expression de *BCL6* avant l'entrée en phase S au cours de la première moitié de la phase G1. *BCL6* est également exprimé dans le thymus ; au sein des cellules T une diminution d'expression est également visible après activation mitogène (Allman et al., 1996).

Le gène *BCL6* code une protéine de 707 acides aminés. Cette protéine appartient à la famille POK (POZ and Krüppel) caractérisée par un domaine N-terminal BTB/POZ (Broad complex, Tramtrack and Bric à brac / POx viruses and Zinc finger) et des doigts de zinc C-terminaux de type Krüppel C₂H₂, au nombre de six dans le cas de *BCL6* (Dhordain et al., 1997).

Le domaine BTB/POZ de *BCL6* a une structure homologue à celui de PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Fingers) : c'est un homodimère en forme d'ailes de papillon avec une interface hydrophobe. Ce domaine a deux rôles : sa dimérisation et possible oligomérisation nécessaire à la fonction normale de la protéine ainsi que l'interaction directe avec les corépresseurs (Ahmad et al., 2003).

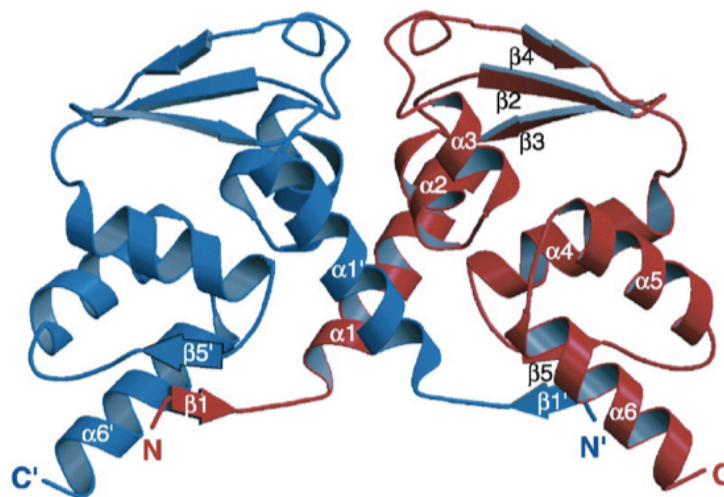


Figure 15 : Structure en homodimère du domaine BTB/POZ de *BCL6* (Ahmad et al., 2003).

Les doigts de zinc (ZF) 3 à 6 sont requis pour la liaison à l'ADN ainsi que pour l'interaction avec certains partenaires, tandis que les ZF1 et 2 n'ont jusqu'alors pas de fonction connue (Masclé et al., 2003). Il a récemment été décrit un variant d'épissage de 650 acides aminés auquel il manque l'exon 7 codant les deux premiers doigts de zinc, cependant sa fonction ne paraît pas différer, suggérant que ces motifs de zinc ne sont pas essentiels (Shen et al., 2008).

Entre ces deux domaines terminaux se trouve une région centrale désordonnée et très peu conservée, hormis quelques motifs.

2) Fonctions de BCL6

Les souris dont le gène *BCL6* a été invalidé par recombinaison homologue présentent des défauts de formation du centre germinatif. BCL6 restreint la différenciation des cellules B et est essentielle au développement des cellules B mémoires à partir de ces centres (Jardin et al., 2007) (Ci et al., 2008).

Les souris invalidées pour ce gène développent une maladie inflammatoire fatale due à la perte des fonctions de BCL6 dans les macrophages et les cellules T. Cette protéine est essentielle au contrôle de la génération et de la maintenance des cellules T CD8⁺ mémoires spécifiques de l'antigène (Jardin et al., 2007) (Ci et al., 2008).

Une étude chez la souris a permis de prouver l'implication de BCL6 dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) par comparaison des phénotypes tumoraux murins et humains. En effet, la translocation chromosomique t(3;14)(q27;q32), impliquant *BCL6* et retrouvée au sein de beaucoup de DLBCL, est mimée chez la souris par l'intégration de ce gène en aval du promoteur de la chaîne lourde des immunoglobulines I μ . Ce promoteur étant actif au sein des cellules B matures, BCL6 est exprimée au stade où elle ne devrait plus l'être. Cette dérégulation d'expression chez la souris entraîne une augmentation du nombre de centres germinatifs. De plus, ces souris transgéniques développent des lymphomes de cellules B d'origine clonale provenant de manière prédominante de la rate. Les tumeurs observées ont un phénotype de cellules B matures et la majorité (75%) présentent des critères histologiques similaires aux DLBCL humains. Ces tumeurs présentent également des mutations somatiques indiquant qu'elles ont transité à travers le centre germinatif. A 20 mois, 80% des souris présentent une altération de la prolifération des cellules B. Cette étude met donc en évidence le caractère oncogénique de BCL6 dans cette pathologie (Cattoretti et al., 2005).

Les centres germinatifs (GC) constituent un compartiment du système immunitaire spécialisé dans la génération de cellules productrices d'anticorps très affins. Ces centres sont formés lors de l'activation dépendante des cellules T qui induit la migration des cellules B aux follicules lymphoïdes où elles se différencient en centroblastes. Ces cellules entrent en expansion clonale, c'est-à-dire qu'elles acquièrent une capacité de division rapide tout en subissant l'hypermutation somatique et la commutation de classe des gènes des Immunoglobulines (Ig), et ce dans le but de générer des anticorps de haute affinité. Cette expansion clonale a lieu dans la zone « sombre » des centres germinatifs. Puis ces

centroblastes transitent dans une zone « claire » plus hétérogène incluant des cellules T, des macrophages et des cellules dendritiques. Grâce aux cellules dendritiques folliculaires elles se différencient en centrocytes par sélection d'affinité de leur anticorps de surface pour l'antigène. Ces centrocytes ayant subi avec succès la maturation d'affinité de leurs gènes d'Ig survivent et sortent du centre germinatif en tant que cellule à durée de vie bien plus élevée, soit plasmatique soit B mémoire, tandis que les autres meurent (Ranuncolo et al., 2007) (Ci et al., 2008).

BCL6 est fortement exprimée et indispensable aux centroblastés ; la diminution de son expression est requise pour la différenciation des cellules B du centre germinatif en cellules mémoires et plasmatiques (Ci et al., 2008).

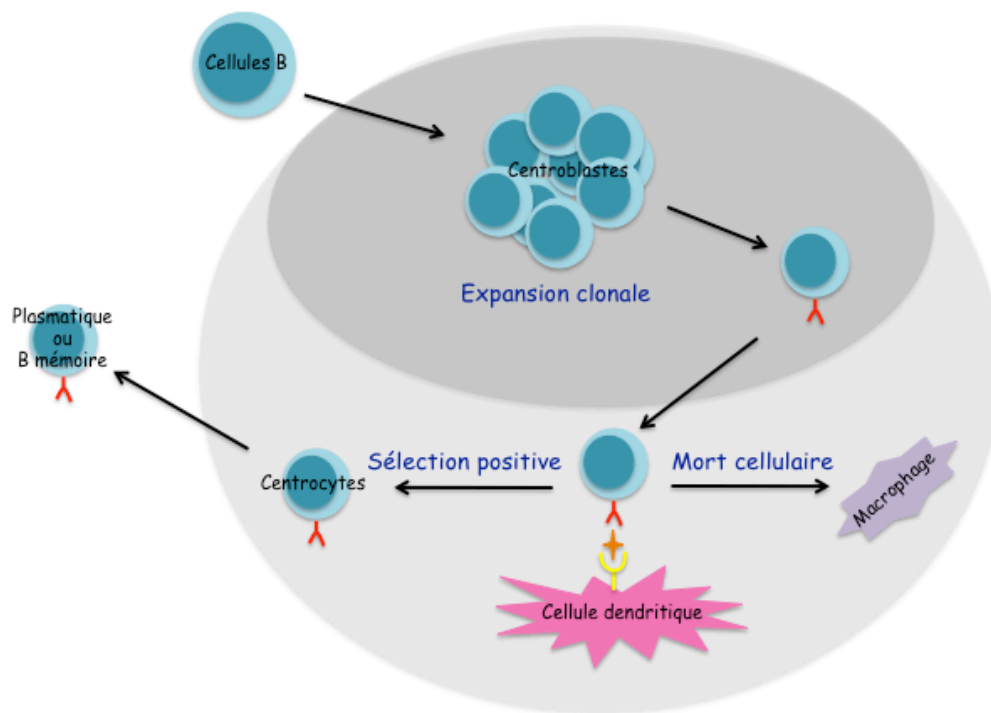


Figure 16 : Représentation schématique du centre germinatif.

Les cellules germinales des centres B ont donc acquis une capacité de tolérance à un statut d'instabilité génomique physiologique potentiellement dangereux (Ci et al., 2008). L'hypermutation somatique et la commutation de classe dépendent de l'activité de l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase). L'abrogation de cette enzyme est suffisante pour prévenir le développement des lymphomes dérivés des cellules des stades GC et post GC, concordant avec l'hypothèse que les événements de remodelage de l'ADN dépendants de AID sont requis pour générer les lésions génétiques secondaires impliquées dans la

formation des cellules B à ces stades tardifs de différenciation (Pasqualucci et al., 2008). Il existe une correspondance entre les régions cibles de cette enzyme et les sites de translocations et de délétions chromosomiques au sein des lymphomes humains des cellules B, dont *BCL6* (Liu et al., 2008).

BCL6 est responsable, au moins en partie, de la tolérance aux dommages à l'ADN au sein des centres germinatifs, via une boucle de régulation impliquant p53.

Certains gènes cibles de *BCL6* tels que le gène d'arrêt du cycle cellulaire *p21* et le gène anti-apoptotique putatif *PIG2* ne sont pas des gènes cibles directs. Par contre, ce sont des gènes cibles de p53. Les protéines et ARNm p53 ne sont pas détectables dans les cellules du centre germinatif exprimant *BCL6*. La diminution de l'expression de *BCL6* est directement associée à l'augmentation des taux de p53 basal et inductible, montrant un rôle de *BCL6* dans la suppression de l'expression de p53 (Phan and Dalla-Favera, 2004). A l'inverse, l'expression forcée de *BCL6* (par blocage de sa dégradation) supprime les réponses apoptotiques aux dommages à l'ADN mises en place par p53 au sein des cellules B. Cette suppression pourrait prévenir l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose facilitant l'expansion rapide du centre germinatif, elle pourrait permettre les stress génomiques requis pour l'hypermutation somatique et la commutation de classe (Phan and Dalla-Favera, 2004).

Au sein de fibroblastes diploïdes humains, l'expression forcée de *BCL6* entraîne l'induction de p53 et la sénescence. Elle atténue la sensibilité aux dommages à l'ADN, augmente le délai de réparation et affecte également la qualité de cette réparation. Cet effet n'est pas toléré non plus au sein des cellules B primaires, exceptées celles en initiation de réaction du centre germinatif qui doivent acquérir la capacité, au moins transitoire, de faciliter la répression via *BCL6* des réponses de p53. L'effet de *BCL6* sur p53 est donc dépendant du contexte cellulaire. Contrairement aux fibroblastes primaires et aux cellules B naïves, les centroblastes présentent un manque de réponse p53 fonctionnelle (Ranuncolo et al., 2008).

Cette tolérance aux dommages à l'ADN dans les centres germinatifs, via *BCL6*, est cependant bien contrôlée.

Un traitement à l'étoposide entraîne une diminution du taux de *BCL6* par dégradation protéasomale proportionnelle à l'amplitude des dommages à l'ADN. Ceci implique la phosphorylation de *BCL6* via la signalisation ATM, permettant son interaction avec Pin1 (Prolyl-isomérase), responsable de la dégradation. Les souris déficientes pour Pin1 présentent une augmentation de la formation des centres germinatifs, ce qui corrèle avec son implication dans le contrôle de l'expression de *BCL6 in vivo* (Phan et al., 2007).

L'exposition des cellules de lymphomes à des agents endommageant l'ADN peut donc induire la phosphorylation et la dégradation protéolytique de BCL6, dépendante de ATM qui est fortement exprimée au sein des centroblastes. Il existerait donc un mécanisme rétrocontrôle de sécurité par lequel l'accumulation de dommages à l'ADN dans les centroblastes pourrait déclencher la signalisation ATM qui dégraderait BCL6 et mènerait les cellules B endommagées à la mort (Ci et al., 2008).

BCL6 est également responsable, en partie, de l'expansion clonale des centroblastes des centres germinatifs.

La prolifération lymphocytaire mise en place par BCL6 peut être expliquée par son action sur la voie du TGF β (Transforming Growth Factor β). En effet, BCL6 interagit avec les transducteurs de cette signalisation : les protéines Smad. Ceci empêche l'interaction avec des coactivateurs tels que p300, réprimant l'activité transcriptionnelle et donc la fonction principale de cette signalisation qu'est l'inhibition de croissance. De plus, dans les cellules de lymphomes B, les taux élevés de BCL6 sont corrélés à la résistance au TGF β (Wang et al., 2008a).

BCL6 est donc un oncogène et la liste de ses gènes cibles est enrichie en gènes régulant la transcription ou modifiant la chromatine, ainsi qu'en gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, le cycle cellulaire et dans l'ubiquitination (Polo et al., 2007).

3) Mécanismes d'action

BCL6 agit par différents mécanismes d'actions qui commencent à être bien définis, impliquant ses différents domaines protéiques.

- Le domaine BTB/POZ

Le domaine BTB/POZ de BCL6, situé en N-terminal, permet l'interaction mutuellement exclusive avec différents co-répresseurs : SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptor) – NCoR (Nuclear receptor CoRepressor 1) (Dhordain et al., 1997), BCoR (BCL6 interacting CoRepressor) (Huynh et al., 2000) (Gearhart et al., 2006). Ce domaine d'interaction protéique étant capable d'homo- et d'hétéro-oligomérisation, il permet

également l'interaction de BCL6 avec d'autres protéines POK : PLZF (Dhordain et al., 2000), Miz1 (Myc-associated zinc-finger protein 1) (Phan et al., 2005).

Miz1 permet à BCL6 de réprimer des gènes cibles par recrutement indirect, ne nécessitant donc pas ses éléments de réponses. Miz1 étant un activateur transcriptionnel, BCL6 réprime son activité. Via cette protéine, BCL6 est recrutée au promoteur de *CDKN1A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) qui code p21 (Phan et al., 2005).

La réponse des cellules B matures aux dommages à l'ADN implique une signalisation dépendante de p53 pour l'activation de *CDKN1A* menant à un blocage en phase G1, ainsi qu'une signalisation indépendante de p53 via Miz1 menant à un arrêt en phase G2/M. BCL6 contrôle donc l'arrêt du cycle cellulaire indépendamment de p53 en réponse aux dommages à l'ADN au sein des cellules B du centre germinatif (Phan et al., 2005).

BCL6 se lie au promoteur et réprime la transcription de *ATR* (*Ataxia Telangiectasia et Rad3 related*), de manière dépendante de NCoR, et pourrait donc atténuer les programmes de réponses aux dommages à l'ADN et de réplication mis en place par la protéine ATR afin de faciliter le phénotype centroblaste. Les points de contrôle de ATR sont liés à la régulation intra phase S ainsi qu'à la signalisation de mort cellulaire. La répression de la fonction de cette protéine par BCL6 contribue donc au phénotype d'atténuation des réponses aux deux types de stress cellulaires rencontrés par les centroblastes au sein du centre germinatif. Dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), la répression de *ATR* est critique pour le cycle cellulaire, la sensibilité aux dommages à l'ADN et les effets de survie mis en place par BCL6 (Ranuncolo et al., 2007).

- La région centrale

La région centrale de BCL6 est acétylée par p300 sur la Lysine K379 au sein d'un motif KKYK. L'acétylation de ce site est critique pour la transformation mise en place par BCL6 et régule négativement sa répression transcriptionnelle (Bereshchenko et al., 2002). Il s'avère que cette acétylation interfère avec le recrutement du complexe NuRD via la protéine MTA3 (Fujita et al., 2004). MTA3 a une expression tissulaire qui diffère un peu des autres protéines MTA. En effet, elle est hautement exprimée au sein des centres germinatifs, dans les mêmes populations de cellules B que BCL6.

MTA3 est requise pour l'activité de répression transcriptionnelle de BCL6 sur plusieurs gènes : *Blimp1* (*B lymphocyte induced maturation protein 1*), *CCL3* (*Chemokine (C-C motif) ligand 3*), *Sdc1* (*Syndecan1*), *XBP1* (*X-box Binding Protein 1*), qui font tous partie du programme transcriptionnel spécifique des cellules plasmiques. L'expression transitoire de BCL6 et MTA3 au sein d'une lignée plasmique est suffisante pour altérer son programme transcriptionnel et le type de protéines synthétisées vers celui de lymphocytes B, reflétant ainsi une inversion de la différenciation (Fujita et al., 2004).

MTA3 est co-exprimée avec BCL6 dans les DLBCL. Dans ces cellules, BCL6 réprime *Blimp1* en liant l'intron 3 et bloque la différenciation en recrutant MTA3 (Parekh et al., 2007).

La région centrale de BCL6 est également responsable du recrutement du corépresseur CtBP (C-terminal Binding Protein), malgré l'absence de motif cible connu. Cette interaction est nécessaire à l'autorégulation négative de BCL6 par répression transcriptionnelle de son propre promoteur (Mendez et al., 2008).

- Les doigts de zinc

BCL6 interagit avec *ARF = CDKN2A* (*Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 2A*) via ses doigts de zinc, ce qui atténue son activité de répression transcriptionnelle (Suzuki et al., 2005). Cette interaction pourrait agir sur p53 puisqu'une des fonctions de ARF est d'interagir avec MDM2, entraînant ainsi l'augmentation de l'expression protéique de p53 en empêchant sa dégradation.

Via ses doigts de zinc, BCL6 interagit également avec ETO (Eight-Twenty One), ce qui ne l'empêche pas de lier simultanément l'ADN. ETO augmente le potentiel de répression transcriptionnel de BCL6, notamment sur la *Cycline D2* (Chevallier et al., 2004).

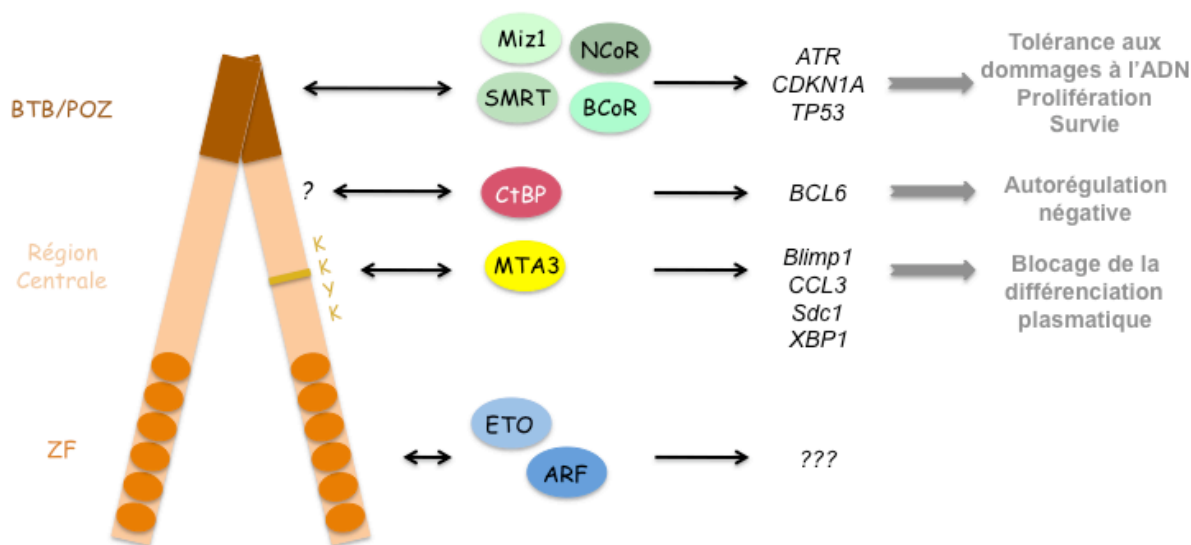


Figure 17 : Fonctions biologiques mises en place par les différents domaines de BCL6 (D'après (Ci et al., 2008)).

4) Des mécanismes moléculaires aux applications thérapeutiques

Malgré le fait qu'elle ne soit pas encore totalement aboutie, la compréhension des mécanismes d'action de BCL6 a permis de mettre en place une stratégie thérapeutique dans le but d'inhiber son action oncogénique dans les lymphomes.

Les interactions du domaine BTB/POZ de BCL6 avec ses différents partenaires sont mutuellement exclusives. La séquence des domaines de liaison de ces protéines n'est pas conservée mais les interactions ont toutes lieu via le sillon latéral situé à l'interface du dimère (Huynh et al., 2000) (Ahmad et al., 2003) (Ghetu et al., 2008). La stratégie a donc été d'empêcher ces interactions afin d'inhiber les fonctions qui en découlent.

Melnick et ses collaborateurs ont mis au point un peptide comprenant le domaine BBD (BCL6 Binding Domain) de SMRT, un tag (His)₆, un domaine de transduction pTAT (Transactivator of Transcription) et un épitope HA. Ce peptide pénètre facilement dans la cellule et se localise dans le noyau. Il est spécifique du domaine BTB/POZ de BCL6 car interagit avec cette dernière et non avec PLZF. Il empêche bien la formation de complexes de BCL6, et la mise en place de sa répression transcriptionnelle (Polo et al., 2004).

L'injection de ce peptide chez la souris abolit la formation de centres germinatifs sans affecter l'architecture globale des organes lymphoïdes (Polo et al., 2004).

Au sein de cellules DLBCL positives pour BCL6, il cause la perte de viabilité, la suppression de croissance et l'apoptose. Il est observé un arrêt du cycle en phase G1 mais jamais de différenciation des cellules (Polo et al., 2004).

Ce BPI (BCL6 Peptide Inhibitor) induit l'expression de p53 dans les cellules DLBCL et augmente sa fonction transcriptionnelle contribuant à la mort cellulaire ; son effet varie selon le statut mutationnel de *p53*. L'administration séquentielle de p53 après traitement au BPI résulte en une augmentation marquée de l'activité anticancéreuse avec une perte de viabilité de 70 à 80%. Le type de mort cellulaire induit (apoptose ou nécrose) dépend du mécanisme d'action de l'agent thérapeutique (p53 entraîne surtout une nécrose) et du contexte génétique de la cellule tumorale (Cerchiatti et al., 2008).

Cependant, ce peptide ne cible que les fonctions de BCL6 mises en place via son domaine BTB/POZ, c'est à dire la survie, la prolifération et la tolérance aux dommages à l'ADN. Il pourrait également être intéressant, au sein des lymphomes, d'induire la différenciation des cellules cancéreuses au lieu de leur mort, ce qui nécessiterait le ciblage des autres fonctions de cette protéine.

Au sein des cellules DLBCL, la combinaison de la déplétion de MTA3, ou d'un traitement stimulant l'acétylation de BCL6 en K379, couplé à l'administration du BPI, a un effet anticancéreux synergique. Une inhibition plus complète de BCL6, via ses deux fonctions biochimiques, serait donc une forme de thérapie plus puissante contre les DLBCL (Parekh et al., 2007).

D. Quand la complexité se complexifie : le cas des protéines BCL11

1) Caractérisation

Ces protéines ayant été découvertes à la même période, indépendamment par plusieurs laboratoires, elles furent baptisées différemment (BCL11A=CTIP1=Evi9, BCL11B=CTIP2=Rit1 β). Pour simplifier les choses nous les nommerons ici BCL11 (B-Cell Lymphoma/leukemia 11).

Les protéines BCL11A et B sont deux homologues dont les gènes se situent respectivement en 2p13 et 14q32.1 chez l'Homme. Des anomalies de la région 2p13 sont associées à des lymphomes malins et à des leucémies lymphoblastiques (Saiki et al., 2000) ; chez la souris c'est un site d'intégration proviral dans les leucémies BXH2 (Nakamura et al., 2000). La

translocation t(2;14)(p13;q32.3) est trouvée dans beaucoup de cellules B malignes, des précurseurs des leucémies lymphoblastiques aiguës aux myélomes (Satterwhite et al., 2001). Ces deux protéines présentent 67% d'identité au niveau nucléique et 61% au niveau protéique. Elles possèdent six doigts de zinc (ZF) de type C₂H₂, des régions riches en Proline et des régions acides. Les domaines ZF présentent 95% d'identité. Les deux gènes possèdent un grand îlot CpG en 5' (Satterwhite et al., 2001).

L'épissage alternatif du pré-ARNm *BCL11A* humain donne quatre isoformes : XL, L, S et XS. La forme prédominante dans les tissus est la protéine BCL11AXL (Liu et al., 2006a).

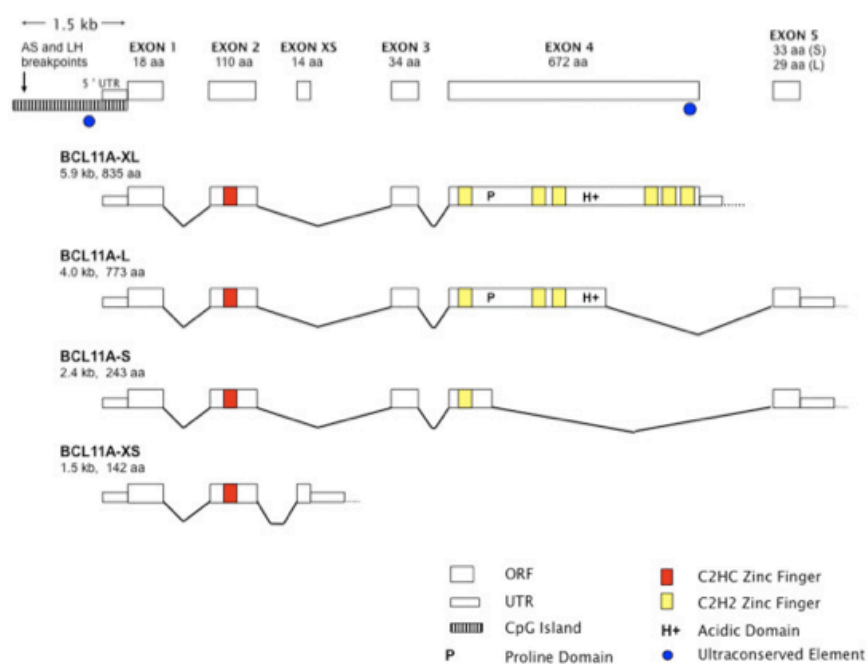


Figure 18 : Différents isoformes de BCL11A (Liu et al., 2006a).

Le profil d'expression de ces homologues diffère. BCL11A est exprimée à fort taux dans le cerveau, la rate, les testicules et au sein de cellules de l'immunité : précurseurs des cellules myéloïdes CD34⁺, cellules B, monocytes, mégacaryocytes (Saiki et al., 2000) (Kuo and Hsueh, 2007). BCL11B, quant à elle, est exprimée préférentiellement dans les cellules T malignes dérivées de patients atteints de lymphomes/leucémies des cellules T (Satterwhite et al., 2001).

Cette expression diffère également au cours de l'embryogenèse. A 10.5 dpc (day post coitum), le transcrite de BCL11B se trouve essentiellement dans l'épithélium de la cavité nasale et dans les couches externes du cortex cérébral avec un faible niveau diffus dans le reste de l'embryon ; BCL11A est quant à elle plus ubiquitaire et diffuse. Leur expression se

restreint au cours du développement pour aboutir à 18.5 dpc à une forte expression des deux homologues dans le système nerveux central (avec quelques différences notoires) et surtout une dominance de l'expression de *BCL11B* au sein du thymus où se trouvent à ce stade les cellules T matures (Leid et al., 2004).

2) Oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs ?

Le rôle oncogénique ou suppresseur de tumeurs de *BCL11A* et *B* est encore débattu.

BCL11B a été découvert chez la souris en tant que nouveau gène suppresseur de tumeurs pour les lymphomes thymiques induits par radiation, il serait haploinsuffisant (Wakabayashi et al., 2003a) (Kamimura et al., 2007b) (Maruyama et al., 2007) (Yoshikai et al., 2008). Une perte d'hétérozygotie est observée dans 71% des thymus atrophiques et dans 89% des lymphomes. L'inactivation de gènes supplémentaires est nécessaire au développement de ces lymphomes (Ohi et al., 2007).

Les radiations sont des agents d'instabilité génomique entraînant des cassures double brin, elles peuvent mener à des réarrangements génomiques et des délétions. Les lymphomes induits par radiations γ chez la souris sont dus à des délétions internes au gène *BCL11B* dues à la recombinaison V(D)J (Sakata et al., 2004).

Par contre, au sein de la leucémie lymphoblastique aigue des cellules T, est détecté un haut taux d'expression de *BCL11B* (Oshiro et al., 2006), suggérant un rôle oncogénique. Dans certains cas, une recombinaison atypique est observée fusionnant la partie proximale du gène *BCL11B* à un segment du gène *TRDD3*, une région de *TCRD*, menant à une transcription active (Przybylski et al., 2005).

BCL11A serait un oncogène potentiel puisque cette protéine a été découverte comme ayant un pouvoir transformant par transfection des cellules NIH3T3 (Nakamura et al., 2000).

D'autre part, 75% des PMBL (Primary Mediastinal B-cell Lymphoma), un sous-type de lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), présentent une augmentation du nombre de copies du gène *BCL11A* (Weniger et al., 2006).

De plus, le virus Epstein-Barr (EBV), associé au développement du lymphome de Burkitt et du carcinome nasopharyngal, s'intègre près du locus *BCL11A* et entraîne une augmentation de son taux d'expression de 100 fois (Luo et al., 2004).

Enfin, *NF1* code la neurofibromine, une protéine activatrice de GTPase qui régule négativement la signalisation RAS. Sa mutation germinale entraîne le syndrome neurofibromatosis de type 1. Les enfants atteints par ce syndrome montrent une incidence élevée à développer des leucémies juvéniles myélomonocytaires qui peuvent progresser en leucémies myéloïdes aigues. Des évènements génétiques coopèrent avec l'inactivation de *NF1* dans la leucémogénèse : *BCL11A* est surexprimé. La transplantation de cellules de la moelle osseuse déficientes en *NF1* surexprimant *BCL11A* résulte en leucémies agressives chez les souris réceptrices ; *BCL11A* serait donc un oncogène (Yin et al., 2009).

A l'encontre de ceci, une étude convaincante, qui a établi l'invalidation du gène *BCL11A* chez la souris, a permis de mettre en évidence un rôle de gène suppresseur de tumeurs. En effet, les souris transplantées avec des cellules hépatiques fœtales *BCL11A*^{-/-} commencent à mourir après 15 jours ; l'origine des leucémies est clonale, les thymocytes sont remplacés par de grands lymphoblastes (Liu et al., 2003).

3) Les mécanismes d'action de ces protéines

La fonction de ces protéines est très variée et est également encore débattue.

- Corépresseurs

BCL11A et *B* ont tout d'abord été identifiées comme corépresseurs des protéines de la famille des facteurs de transcription COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor), une sous-famille des récepteurs nucléaires orphelins (Avram et al., 2000).

BCL11B réprime la phase initiale de transcription du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) ; elle est fixée à la région LTR (Long Terminal Repeat) via son interaction avec SP1. Les sites de liaison à SP1 sont suffisants pour son activité (Marban et al., 2005). Cette répression implique le complexe NuRD (Cismasiu et al., 2008).

BCL11A est modifiée par SUMO1, ce qui, cependant, n'affecte pas son activité transcriptionnelle. Elle interagit également avec des protéines SUMOylées de manière non covalente via SUMO1 (Kuwata and Nakamura, 2008).

- Répresseurs transcriptionnels directs

Les ZF centraux (3 et 4) de BCL11A et B sont hautement conservés. Ils ont donc un consensus commun de liaison à l'ADN défini *in vitro* qui est un motif riche en GC dont le cœur est GGCCGG (Avram et al., 2002).

La répression mise en place par BCL11B est sensible à la nicotinamide, un inhibiteur des HDACs de classe III. BCL11B recrute SIRT1 au promoteur, entraînant la désacétylation des histones H3 et H4 (Senawong et al., 2003). Le même phénomène a été décrit pour BCL11A (Senawong et al., 2005).

Au sein des cellules T, BCL11B interagit avec les composants du complexe NuRD (Mi2 β , MTA1, MTA2, HDAC1, HDAC2, RbAp46, RbAp48, MBD3). Il en est de même pour BCL11A au sein des cellules B. Cette interaction se fait via les 45 acides aminés N-terminaux de la protéine MTA1 ; celle-ci est responsable de la répression mise en place par BCL11B à un promoteur cible (Cismasiu et al., 2005). BCL11B est présent en même temps que MTA2, HDAC2 et RbAp46/48 au promoteur de *p57KIP2*, qui code un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines de la phase G1 (Topark-Ngarm et al., 2006).

BCL11B réprime également la transcription de la région LTR de manière indirecte. En effet, elle relocalise l'activateur transcriptionnel spécifique du VIH TAT à l'aide de HP1 dans un environnement nucléaire ne permettant pas la transcription (Rohr et al., 2003).

- Activateur

BCL11B est exprimé à un taux similaire dans les lymphocytes T CD4⁺ non engagés et activés (activation PMA-Ionomycine qui mime celle TCR-CD28). Cette protéine augmente le taux d'ARN messager IL-2 (Interleukine 2) et ceci requiert l'activation des cellules T ; elle lie et active le promoteur de *IL-2* à travers une région localisée dans la moitié proximale du site US1 (Upstream Sequence 1). Au sein des cellules activées, BCL11B est associée à p300. Dans ce contexte, elle serait plutôt un activateur transcriptionnel (Cismasiu et al., 2006).

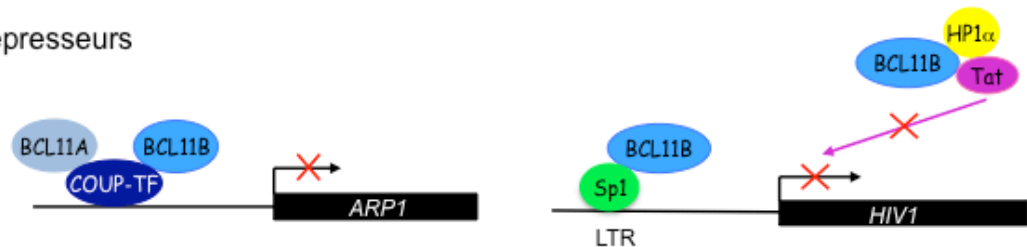
En plus du site US1, BCL11B augmente la transcription à travers des sites NF κ B localisés en -210 -190, dans le contexte de l'activation des cellules T. Cependant, elle ne se lie pas à ces sites ni n'interagit avec le complexe NF κ B(p50/p65)-ADN. Elle agit spécifiquement sur l'activation de IKK (IkB Kinase) mise en place par la signalisation TCR/CD28. BCL11B joue un rôle dans l'activation des gènes dépendants de NF κ B (Cismasiu et al., 2009).

- Autre mécanisme

BCL11A a été initialement découverte comme interagissant avec BCL6 via le BTB/POZ de cette dernière (Nakamura et al., 2000) (Saiki et al., 2000). Au sein des DLBCLs, est observée une corrélation entre les expressions de BCL6 et BCL11AXL (Pulford et al., 2006). Cette protéine interagit avec BCL6 mais n'affecte pas sa répression transcriptionnelle. BCL11AXL est exclusivement localisée en foyers au sein de la matrice nucléaire et colocalise avec la majeure fraction de BCL6 nucléaire. Cependant, le rôle de cette interaction reste inconnu (Liu et al., 2006a).

Répression

→ Corépresseurs



→ Répression par liaison directe à l'ADN



Activation

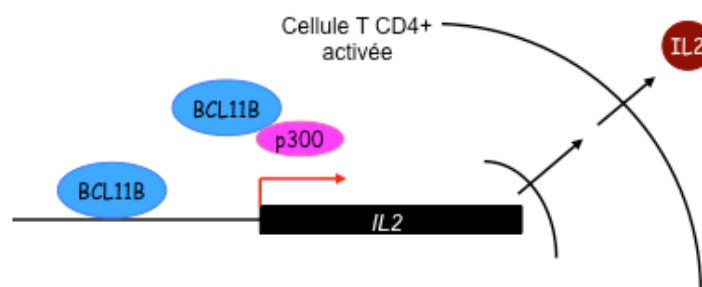


Figure 19 : Différents mécanismes d'action des protéines BCL11.

Les mécanismes d'action des protéines BCL11 sont donc encore mal définis.

Tout comme les autres protéines ZnFs (Zinc-Fingers) possédant de multiples doigts de zinc, elles pourraient être des intégrateurs de plusieurs voies. En effet, tandis que certains domaines ZnF reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques, d'autres peuvent lier l'ARN, et beaucoup peuvent être responsables d'interactions protéiques (Gamsjaeger et al., 2007).

Un exemple est la protéine ZNF423, un facteur de transcription contenant 30 doigts de zinc de type Krüppel C₂H₂. Cette protéine est impliquée dans les développements de l'épithélium olfactif et lymphocytaire. Elle a également été identifiée comme cofacteur du complexe Smad1/Smad4 dans la voie de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein). Les groupes de doigts de zinc mettant en place ces deux voies de signalisation sont séparables et indépendants les uns des autres. De plus, ZNF423 est nécessaire à l'arrêt de croissance ainsi qu'à la différenciation induite par l'acide rétinoïque (Huang et al., 2009) (Gronemeyer and Zelent, 2009).

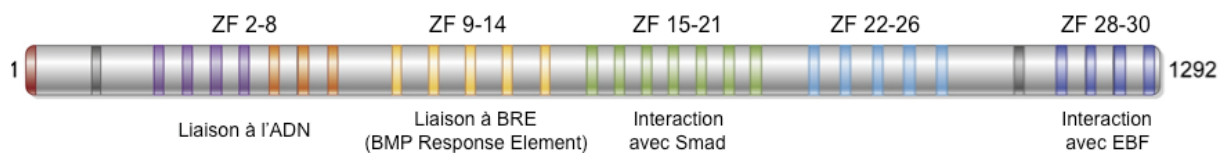


Figure 20 : Représentation schématique de ZNF423 (d'après Gronemeyer and Zelent, 2009).

4) Les fonctions des protéines BCL11

- BCL11A
 - Système immunitaire

Les précurseurs lymphocytaires ont un système intrinsèque qui induit l'instabilité génomique : les recombinaisons V(D)J qui génèrent les gènes d'immunoglobuline (Ig) ainsi que les récepteurs des cellules T fonctionnels (Figure 21).

BCL11A est essentielle pour le développement lymphoïde normal (Liu et al., 2003). Des souris invalidées pour *BCL11A* ne forment pas de cellules B. Plusieurs gènes normalement exprimés dans les cellules B ne le sont pas dans le foie foetal de ces souris, les recombinaisons D-J du stade pré-B ne se font plus (Liu et al., 2003). Les réarrangements V(D)J du locus de la chaîne lourde des Immunoglobulines sont caractéristiques des cellules pro-B (suivant le stade B précoce E-B et précédant le stade pré-B). L'expression de *BCL11A* est augmentée en E-B et pro-B (Hystad et al., 2007). De plus, cette protéine est requise

pour le développement thymocytaire puisque 1/3 des mutants ont le thymus plus petit avec une faible cellularité (Liu et al., 2003).

BCL11AXL est détectée dans le noyau de cellules de la zone du manteau, la majorité des cellules du centre germinatif et une sous population de cellules au sein de l'aire folliculaire des amygdales et nodules lymphatiques. Ces cellules ont une origine B. Elle est exprimée à une majorité des stades de différenciation, des pré-B aux cellules du centre germinatif ou activées ; elle est par contre absente des cellules originaires du plasma. La diminution de l'expression de *BCL11A* pourrait être requise pour la différenciation plasmatique (Pulford et al., 2006).

- Hémoglobine fœtale

L'hémoglobine fœtale (HbF) est un tétramère composé de deux α -globines adultes et deux γ -globines fœtales de type β . Après la naissance a lieu la permutation fœtale : les γ -globines sont remplacées par deux β -globines.

Les cellules F sont des érythrocytes contenant des quantités mesurables de HbF, elles sont présentes chez les patients atteints de la maladie des cellules en faucille et de la thalassémie β . Chez l'adulte sain, cette HbF est présente à des taux résiduels. *BCL11A*, qui est exprimé au sein des érythrocytes, fait partie de deux groupes de marqueurs génétiques qui ont une association hautement significative avec les cellules F (Menzel et al., 2007).

Dans la lignée érythroïde, *BCL11A* est régulé au cours du développement. L'extinction de *BCL11A* dans les progéniteurs érythroïdes à J0 de différenciation entraîne une augmentation du taux de γ -globine à J7 de différenciation ; si l'extinction est plus tardive, l'effet est bien moindre. La protéine *BCL11A* se trouve sur le site HS3 de la LCR, une région se situant en amont de γ -globine qui, quand elle est délétée, est associée à un phénotype « fort HbF », et en aval de *A γ -globine* délétée dans certaines formes héréditaires d'HbF persistante (Sankaran et al., 2008).

D'autre part, le butyrate de sodium induit la différenciation cellulaire et l'expression de HbG dans les cellules K562 (cellules lymphoblastiques de leucémie myéloïde chronique) ainsi que la diminution d'expression de *BCL11A*. Cette protéine réprime HbG2 (Chen et al., 2009).

- BCL11B
 - Système immunitaire

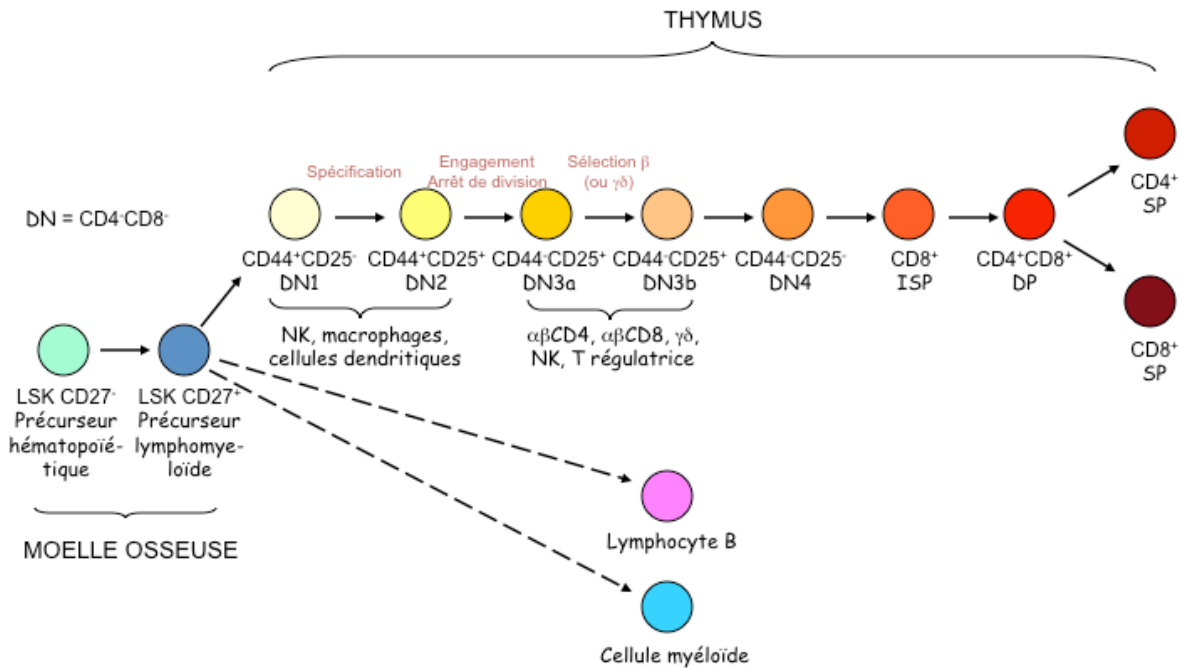


Figure 21 : Stades de développement des cellules T. Spécification : début de l'expression des gènes de la lignée T, premiers réarrangements de loci TCR (DJ β , VJ β). Engagement : exclusion de tout sauf des cellules T (l'expression des gènes T augmente, réarrangements TCR). Sélection β : complexe pré-TCR fonctionnel à la surface.

Les souris invalidées pour *BCL11B* meurent durant le 1^o jour après la naissance. Le thymus présente une désorganisation du cortex et de la médulla, la frontière entre les deux a disparu. Il est plus petit, les cellules sont au nombre de 10% et de grande taille. La transition des thymocytes du stade CD44⁺CD25⁺ à CD44⁻CD25⁻ est affaiblie, il y a une faible expression du TCR β et le réarrangement V β à D β est diminué. Avant la naissance, une perte des cellules CD4⁺CD8⁺ ainsi qu'une augmentation des CD44⁻CD25⁺ sont observées. Le défaut de développement des cellules T associé à la déficience en BCL11B est donc initié au stade DN3. Les thymocytes des souris *BCL11B*^{-/-} sont hautement susceptibles à l'apoptose (Wakabayashi et al., 2003b). La perte de BCL11B interrompt donc le développement des thymocytes $\alpha\beta$ mais n'a pas d'effet sur les cellules T $\gamma\delta$ ni sur les cellules B (Wakabayashi et al., 2003b).

Les souris doublement invalidées *p53*^{-/-} *BCL11B*^{-/-} meurent également pendant le 1^o jour suivant la naissance. Chez ces souris, les thymocytes présentent une transition un peu plus importante du stade double négatif DN au stade immature simple positif ISP, par contre la

cellularité thymique n'est pas restaurée. La perte de fonction de p53 n'est donc pas suffisante pour la différenciation en double positif DP mais elle promeut la transition du stade DN3 (stade auquel sont bloqués les thymocytes *BCL11B*^{-/-}) au stade ISP, probablement en prévenant l'apoptose des thymocytes ISP (Okazuka et al., 2005).

L'introduction du TCR $\alpha\beta$ dans les thymocytes *BCL11B*^{-/-}, ainsi que dans les thymocytes sauvages, augmente le ratio DN4/DN3. Le TCR $\alpha\beta$ permet l'échappement des thymocytes DN4 *BCL11B*^{-/-} à l'apoptose (Inoue et al., 2006).

BCL11B fait partie intégrante du programme de régulation spécifique de la lignée T, elle est induite dans les premiers stades en réponse à la signalisation Notch/Delta au sein des précurseurs hématopoïétiques. L'expression de *BCL11B* est complètement dépendante des conditions de différenciation en lignée T. En effet, son augmentation entre les stades DN1 et DN2 est accompagnée de la sous régulation réciproque de *BCL11A*, qui est fortement exprimé au sein des cellules précurseurs et des non T (Tydell et al., 2007).

La mise en place d'un système Cre-Lox a permis l'étude de la déplétion de *BCL11B* chez les souris adultes. Leur thymus est plus petit avec 35% de thymocytes et une réduction majeure des populations simples positives SP CD4⁺ ou CD8⁺ qui présentent un taux réduit de TCR β , donc sont immatures. Les nodules lymphatiques mésentériques et la rate sont considérablement élargis, leur cellularité totale est augmentée mais le nombre de CD4⁺ et CD8⁺ est réduit. BCL11B est essentielle pour la sélection positive des lignées CD4 et CD8, la lignée CD4 est plus altérée. Ce défaut n'est pas causé par le TCR lui-même puisque les événements proximaux de la signalisation TCR sont altérés. De potentiels signaux inappropriés pourraient être initiés dans les cellules double positives DP déficientes en BCL11B car des protéines membranaires non exprimées normalement sont présentes ; ceci pourrait interférer avec la signalisation TCR et le programme à ce stade du développement de la cellule T (Albu et al., 2007).

D'autre part, BCL11B entraîne la transcription et la sécrétion d'interleukine 2 de manière directe (Cismasiu et al., 2006) et indirecte (Cismasiu et al., 2009). BCL11B augmente la transcription de ce gène à partir des sites NF κ B dans le contexte de l'activation des cellules T par le TCR/CD28, elle agit spécifiquement sur l'activation de IKK mise en place par le TCR/CD28 (Cismasiu et al., 2009).

- Apoptose

Comme nous l'avons vu précédemment, BCL11B paraît impliquée dans l'apoptose.

L'extinction de *BCL11B* au sein de lignées de cellules T transformées entraîne l'apoptose dépendante des caspases. Une diminution du taux de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL est

observée, ainsi qu'une augmentation du taux de l'ARNm de l'inducteur apoptotique TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand). Ceci montre donc un rôle anti-apoptotique de BCL11B (Grabarczyk et al., 2007).

La réplication de l'ADN ainsi que les dommages induits par les UV génèrent des cassures simple brin ssDNA (single strand) qui servent de signal pour le point de contrôle de la phase S. Ces dommages activent ATR (ATM- and the Rad3-related kinase) et ses kinases de point de contrôle Chk1 et 2 (Checkpoint kinase). Le manque de BCL11B entraîne un défaut latent dans le point de contrôle de la phase S, dû notamment à la forte diminution de la phosphorylation de Chk1, révélée par la stimulation de la croissance (cellules cultivées en présence de 10% de sérum). Ces cellules présentent une répression transcriptionnelle de *p27* (inhibiteur de CDK (Cyclin Dependent Kinase)) et *Bcl-xL*, donc une réponse apoptotique (Kamimura et al., 2007a).

- VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)

Au cours de la phase précoce de l'infection par le VIH, il y a activation de la transcription virale entraînant l'accumulation de l'activateur transcriptionnel TAT. TAT forme un complexe ternaire avec P/CAF et p300 et est responsable de l'activation de la transcription de l'ADN viral intégré durant la phase tardive de l'infection. BCL11B réprime l'activation transcriptionnelle mise en place par TAT, donc la réplication virale. Elle forme une structure en « sandwich » emprisonnant TAT à l'aide de HP1 α qui se trouve à l'extérieure de la structure, TAT et HP1 α n'interagissent pas directement, mais grâce à BCL11B qui sert d'intermédiaire (Rohr et al., 2003).

BCL11B réprime également la phase initiale de la transcription du VIH par liaison à la région LTR via les sites Sp1 (Marban et al., 2005). Cette protéine recrute HDAC1 et 2 via le complexe NuRD au site de liaison Sp1 ainsi qu'à la région Nuc1 (un nucléosome situé immédiatement en aval du site d'initiation de la transcription et impliqué directement dans l'activité de la LTR, mais sur lequel BCL11B n'est pas présente) (Marban et al., 2007) (Cismasiu et al., 2008). Ceci est corrélé avec le recrutement des protéines de l'hétérochromatine HP1 α , β et γ ainsi que celui de l'histone méthyltransférase SUV39H1 responsable de la méthylation H3K9 de la région Nuc1. Le traitement au PMA, qui stimule la transcription du VIH, est responsable de la permutation BCL11B par CBP sur Sp1 (Marban et al., 2007).

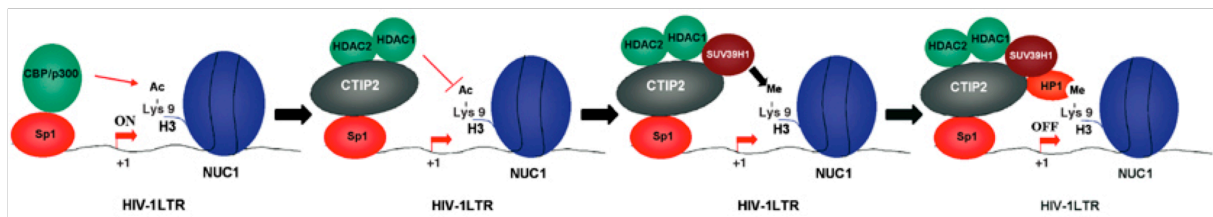


Figure 22 : Rôle de BCL11B (CTIP2) dans la répression de la phase précoce de l'infection par le VIH (Marban et al., 2007).

- Développement neuronal

Les neurones moteurs corticospinaux (CSMN) sont localisés dans la couche corticale V. BCL11B se trouve dans la couche V du cortex avec un profil d'expression qui s'étend des zones rostrocaudale à médiolatérale. C'est un marqueur spécifique de sous-type neuronal : CSMN et d'autres populations de neurones évolués avec des projections subcérébrales. BCL11B est hautement exprimée par les cellules de la plaque corticale, elle commence à être exprimée dans les CSMN post-mitotiques. Chez les souris déficientes pour *BCL11B*, les CSMN ne se connectent plus à la corde spinale et les axones excitants le néocortex sont désorganisés (Arlotta et al., 2005).

Le striatum joue un rôle central dans la coordination des mouvements, les émotions et la cognition. Les projections neuronales en dehors du striatum sont les MSN (GABAergiques medium-sized spiny neurons) qui représentent 90-95% des neurones striataux. Dans les maladies de Huntington et de Parkinson est observée une dégénérescence des MSN. BCL11B commence à être exprimée dans les MSN post mitotiques au sein de la zone du manteau du striatum en développement. Son taux d'expression augmente dans les MSN qui migrent radialement et cette expression est maintenue à haut niveau chez l'adulte. Chez les souris déficientes en *BCL11B* la différenciation des MSN est affectée, les plaques striatales ne se développent pas normalement (Arlotta et al., 2008).

La maladie de Huntington (HD) est due à une protéine mal formée (stretch de tri nucléotides répétés au sein du gène HD), l'huntingtin (htt). Cette protéine est exprimée dans tout le corps mais la majorité des changements neurodégénératifs ont lieu dans le striatum. Les souris mimant cette maladie sont les R6/1 ; elles expriment l'exon 1 du gène HD humain qui contient la répétition responsable de la maladie. Dans le cerveau, BCL11B interagit avec htt et de manière plus forte avec la protéine mutée. L'expression de BCL11B est augmentée dans les cellules contenant la forme mutée de cette protéine. Ces cellules présentent un

défaut du métabolisme mitochondrial qui peut être atténué en sur exprimant BCL11B (Desplats et al., 2008).

- Développement de la peau

L'expression de BCL11B est détectée dans l'ectoderme à E10.5, elle persiste à E12.5 qui est le stade de développement de la peau marqué par la formation et la stratification de la couche basale embryonnaire : BCL11B colocalise avec le marqueur de cellules basales kératine 14. Au stade E14.5, certaines cellules du futur derme expriment également BCL11B. Puis, en fin de développement embryonnaire (E16.5-18.5), elle est fortement exprimée dans la couche basale de l'épiderme. Au cours de ces stades, les cellules positives pour le marqueur de prolifération Ki67 le sont également pour BCL11B. Dans la peau adulte, cette protéine est présente dans la majorité des cellules de la couche basale mais pas dans le derme, en tout cas l'expression est moins forte que dans l'embryon (Golonzhka et al., 2007).

- Développement des dents

Les souris déficientes pour *BCL11B* présentent des défauts de développement des dents. La perte de cette protéine résulte en la dérégulation de gènes codant des protéines cruciales pour le développement améloblastique (formation de l'émail dentaire) et l'intégrité structurale de la mâchoire et des dents (Golonzhka et al., 2009).

Il est donc difficile de conclure sur un rôle ou une implication générale de ces protéines au sein d'un domaine ou d'une fonction spécifique. Ceci sera peut être possible d'ici quelques années, lorsque toutes ces études « compliquées » car différentes finiront par éclaircir les choses.

III. La SUMOylation

A. Généralités

1) Les protéines SUMO

Les protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) appartiennent à la famille des Ubls (Ubiquitin-like protein modifiers) comprenant des protéines apparentées à l'Ubiquitine qui,

tout comme elle, peuvent être conjuguées à des lipides ou protéines par leur extrémité C-terminale (Kirkin and Dikic, 2007). Ces protéines se trouvent initialement sous la forme d'un précurseur qui est activé par clivage d'un peptide C-terminal par les Ulps (Ubiquitin-like protein specific proteases), produisant une extrémité Glycine-Glycine mature (Johnson, 2004).

La séquence en acides aminés de SUMO1 a 18% d'identité avec celle de l'Ubiquitine, elle possède notamment 20 résidus de plus au niveau d'une queue N-terminale flexible en solution. Leurs formes tridimensionnelles sont par contre totalement superposables, à l'exception près de la queue de SUMO (Johnson, 2004).

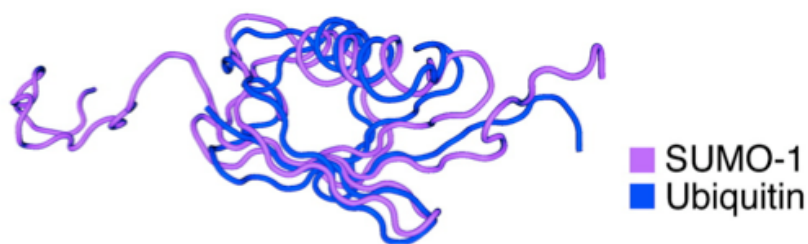


Figure 23 : Superposition des molécules SUMO1 et Ubiquitine (Johnson, 2004).

Il existe 4 homologues nommés SUMO1 à 4. SUMO2 et 3 sont très proches car présentant 95% d'identité ; ils forment un « pool » de molécules libres au sein de la cellule et leur conjugaison aux cibles est induite en réponse aux stress. A l'inverse, la majorité de la protéine SUMO1 est conjuguée et n'est pas induite par le stress, elle présente 50% d'identité aux deux autres (Johnson, 2004).

SUMO4 possède une homologie de 86% avec SUMO2. A l'instar des trois autres, son extrémité C-terminale ne peut être clivée car une Proline en position 90 empêche la digestion et la libération du doublet Glycine-Glycine. La SUMOylation par SUMO4 ne pourrait donc avoir lieu faute de maturation (Owerbach et al., 2005). Cependant, une étude récente montre que SUMO4 inhiberait l'activité transcriptionnelle de NF κ B par la SUMOylation de I κ B, favorisant le rôle de séquestration de NF κ B dans le cytoplasme par I κ B. De plus, NF κ B se lie au promoteur de *SUMO4* et inhibe sa transcription, suggérant une régulation par rétrocontrôle négatif (Wang et al., 2009).

2) Les sites de SUMOylation

Tout comme l'Ubiquitine, la SUMOylation modifie des Lysines. Mais à l'inverse, dans la majorité des cas décrits, elle cible un site consensus qui s'avère indispensable puisque cette modification s'effectue généralement au sein d'une région désordonnée. Ce site est composé d'un cœur Ψ KxE où Ψ est un acide aminé hydrophobe (Isoleucine, Leucine ou Valine), K la Lysine cible, x n'importe quel résidu et E un acide Glutamique (acide aminé acide qui est remplaçable par un acide Aspartique D) (Bernier-Villamor et al., 2002).

Une récente étude bioinformatique a permis de déterminer un site consensus plus large spécifique de la lignée métazoaire : le motif KEPE : [MLIVFT]K.EP.{1,4}[DE]. Ces motifs sont largement représentés au sein de facteurs de transcription et de protéines impliquées dans la modification de la conformation de la chromatine ; un rôle dans la modulation de l'expression des gènes semble donc inévitable. Plusieurs sites KEPE sont connus pour être SUMOylés. Il est quelquefois conservé au sein de protéines orthologues depuis plus de 500 millions d'années comme C/EBP de la drosophile aux vertébrés (Diella et al., 2009).

Des études phylogéniques ont permis d'étendre le consensus initial dans certains cas biologiques précis, comme par exemple lors de l'association de la SUMOylation avec la phosphorylation. Ces sites consensus seront décrits plus loin (Anckar and Sistonen, 2007) (Hietakangas et al., 2006) (Yang et al., 2006).

3) Le système de conjugaison/déconjugaison

Tout comme l'ubiquitination, la SUMOylation s'effectue par formation d'une liaison isopeptidique entre le groupe carboxy-terminal de SUMO et le groupe ϵ amino de la Lysine du substrat. Les enzymes impliquées sont spécifiques de cette voie mais le mécanisme est identique : l'enzyme activatrice E1 est responsable de l'activation, dépendante de l'ATP, de l'extrémité C-terminale de SUMO et du transfert à l'enzyme de conjugaison E2, qui, elle, permet la transmission au substrat, grâce à l'assistance des ligases E3. Ces deux dernières catégories d'enzymes contribueraient à la spécificité du substrat (Johnson, 2004).

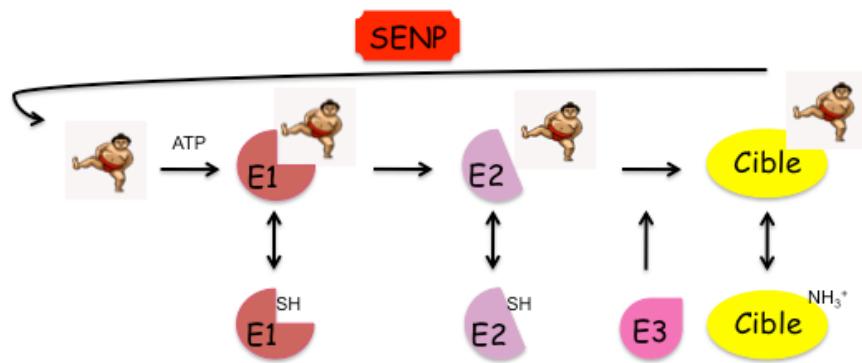


Figure 24 : Système de conjugaison/déconjugaison de SUMO

Jusqu'à présent une seule enzyme E2 a été décrite : Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9). Cette protéine se lie directement au site consensus. L'étude de l'interaction entre RanGAP1 et Ubc9 montre que les acides aminés précédant et suivant le cœur consensus ne sont pas en contact avec Ubc9, suggérant que le motif ΨKxE est suffisant pour la modification. Le complexe formé par ces deux protéines révèle une plate-forme et une position unique pour la Lysine cible avec le site catalytique de Ubc9. Ceci est également le cas pour $I\kappa B\alpha$ et p53 (Bernier-Villamor et al., 2002).

Il a cependant été montré depuis que des résidus acides proches du site consensus favorisent l'interaction avec Ubc9 ; ceci sera décrit plus loin (Liu et al., 2006b) (Anckar and Sistonen, 2007).

La séquence primaire en acides aminés n'est pas toujours suffisante pour permettre la SUMOylation. En effet, le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) de HSF2 est SUMOylé tandis que celui de son homologue HSF1 ne l'est pas. Dans ce cas, l'interaction entre Ubc9 et HSF2 s'effectue en dehors des Lysines cibles. Le mécanisme proposé est que, bien que la boucle contenant le DBD soit accessible chez HSF1, sa séquence C-terminale bloque la reconnaissance et retranche le térapeptide consensus du site actif de Ubc9 (Anckar et al., 2006).

Les enzymes E3 diffèrent en fonction du substrat conférant ainsi une certaine spécificité à la SUMOylation. Jusqu'alors 4 types distincts ont été décrits.

Le premier type concerne les membres de la famille PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) qui contiennent un domaine SP-RING qui ressemble au domaine à activité ligase RING trouvé dans beaucoup de E3 pour l'Ubiquitine.

Le second type est constitué par une région de 300 résidus contenant le domaine IR (Internal Repeat) située au sein de la protéine de pore nucléaire RanBP2.

Le troisième type concerne la protéine du groupe *polycomb* Pc2 (Johnson, 2004).

Enfin, le quatrième type de E3 ligases, découvert plus récemment, représente les HDACs de classe II HDAC4, 5 et 7, impliquant leur domaine coiled coil (Zhao et al., 2005) (Gao et al., 2008). Elles pourraient cependant plutôt être des « E3 facilitases » recrutant des partenaires directement responsables de cette activité de ligation de SUMO.

La SUMOylation étant une modification hautement labile et transitoire, il existe des enzymes de déconjugaison qui sont également spécifiques de cette voie. Ce sont les Ulps (Ubiquitin-like protein specific proteases) chez la levure et les septines SENP (SUMO Specific Protease) chez l'Homme. Ces protéines sont également responsables du clivage nécessaire à la maturation de SUMO permettant son activation (Au et al., 2009).

4) Les chaînes polySUMO

SUMO2 et 3 possèdent un site de SUMOylation au sein de leur partie N-terminale (Lysine 11). Ces protéines, ainsi que SUMO1, possèdent un domaine SIM (SUMO Interacting Motif) nécessaire à l'interaction non covalente avec une molécule de SUMO. Ce motif est constitué d'un petit cœur hydrophobe précédé ou suivi d'un « stretch » de résidus acides et/ou phosphorylables, il s'aligne comme un feuillet β avec une région à la surface de SUMO (Ulrich, 2008), le consensus de son cœur hydrophobe est Val/Ile-x-Val/Ile-Val/Ile (Kerscher, 2007). Les chaînes polySUMO de SUMO2 et 3 sont formées par création d'une liaison isopeptidique entre le résidu Glycine C-terminal d'une molécule et la Lysine 11 d'une autre. Il est envisagé que SUMO1 termine ces chaînes (Tatham et al., 2001).

Ces motifs SIM permettent également l'interaction d'une protéine SUMOylée avec un partenaire, grâce à des forces électrostatiques. Tandis que *in vitro* quelques acides aminés hydrophobes sont suffisants pour permettre la liaison à SUMO, *in vivo* les résidus autour du cœur hydrophobe influencent la liaison (Uchimura et al., 2006). La signature du SIM étant limitée au petit motif formé par le feuillet β , l'orientation peut être parallèle ou antiparallèle. Une Lysine de SUMO1 n'est pas conservée dans SUMO2, ce qui pourrait expliquer la préférence d'interaction de cette dernière avec des SIM qui n'ont pas de résidus à charge négative. Les sillons hydrophobes des différents isoformes de SUMO ont une position un peu

différente malgré le respect des résidus basiques, suggérant que le réarrangement des résidus acides et hydrophobes des SIM pourrait dicter leur capacité à lier spécifiquement les isoformes SUMO (Kerscher, 2007).

5) Les régulateurs directs de SUMOylation

RSUME (RWD-domain-containing SUMOylation Enhancer), une protéine induite par le stress récemment découverte, augmente la SUMOylation de cibles mais ne possède pas d'activité de conjugaison. Son domaine RWD (RING finger-containing proteins, WD-repeats-containing-proteins, and yeast DEAD(DEXD)-like helicases) d'interaction protéique est essentiel à cette activité (Carbia-Nagashima et al., 2007).

RSUME aide à la polymérisation des chaînes libres de SUMO2 et 3 médiée par Ubc9 ; elle permet la liaison de SUMO1 et E1 à Ubc9 (Carbia-Nagashima et al., 2007).

A l'inverse, aucune protéine empêchant l'activité de SUMOylation n'a été mise en évidence à ce jour. Par contre les STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases) permettent la dégradation de certaines protéines SUMOylées ; elles sont donc responsables de la diminution du « pool » de protéines conjuguées à SUMO. Cette famille contient un domaine RING finger Ubiquitine-ligase et reconnaît les protéines SUMOylées via un motif SIM ; les STUbLs peuvent ainsi mener les protéines modifiées par SUMO à la dégradation par le protéasome (Perry et al., 2008). Leur fonctionnement sera détaillé plus loin.

6) Importance de la voie SUMO

Un défaut de système de conjugaison de SUMO chez la levure entraîne une instabilité chromosomique, une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN et des problèmes au cours de la division cellulaire (Ulrich, 2005). Chez *S.cerevisiae*, l'abolition de la signalisation SUMO mène à un arrêt du cycle en G2/M (Bossis and Melchior, 2006).

Chez la souris, l'invalidation de SUMO1 par recombinaison homologue n'a pas d'effet. En effet, son absence est compensée par SUMO2 et 3 (Evdokimov et al., 2008) (Zhang et al., 2008). Un déplacement vers les formes de plus hauts poids moléculaires des conjugués SUMO2 et 3 est observable, ce qui pourrait refléter l'augmentation de la longueur des chaînes polySUMO comme un résultat de l'absence de la molécule de terminaison SUMO1

(Evdokimov et al., 2008). Les différents paralogues SUMO codés par différents gènes ont donc des fonctions redondantes *in vivo*, ce qui pourrait être une stratégie cellulaire pour maintenir le taux de SUMOylation de protéines clés (Evdokimov et al., 2008) (Zhang et al., 2008).

L'abolition de la voie de conjugaison par invalidation de Ubc9 chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce, avant E7.5 (l'embryon s'implante avant de dégénérer). La voie SUMO est essentielle pour la croissance de la masse cellulaire interne (ICM) au stade blastocyste ainsi que pour la phase de développement post-implantatoire (Nacerddine et al., 2005). Il est observé une mort par apoptose des cellules de l'ICM mais pas des futurs tissus extra-embryonnaires. Ce travail a permis de démontrer que, chez les mammifères, la SUMOylation est critique pour la structure, la ségrégation et la transmission correcte des chromosomes. Sa perte entraîne des anomalies drastiques de l'architecture nucléaire et subnucléaire au détriment de la survie cellulaire (Nacerddine et al., 2005).

B. Fonctions

Cette partie, non exhaustive, vise une vue générale des différents rôles biologiques que peut avoir la SUMOylation. La plupart de ces fonctions seront décrites de manière plus détaillée au cours du chapitre suivant (IV Relations SUMOylation – autres modifications).

1) Transcription

La modification SUMO d'un grand nombre de régulateurs transcriptionnels suggère un rôle important de cette modification post-traductionnelle dans la régulation de l'expression des gènes.

- Répression transcriptionnelle

Dans la plupart des cas décrits jusqu'à présent, SUMO inhibe l'activité transcriptionnelle. La modification SUMO de plusieurs facteurs de transcription pourrait promouvoir l'interaction avec des protéines qui ont une faible ou pas d'affinité pour le substrat non modifié.

C'est le cas de Daxx (Death-associated protein). Cette protéine supprime le potentiel de répression transcriptionnelle de certains facteurs de transcription SUMOylés (récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes, Smad4 et CBP) en interagissant avec eux via son SIM.

D'autre part, elle est recrutée aux corps nucléaires de manière dépendante de la SUMOylation de PML (Lin et al., 2006).

La molécule de SUMO seule est suffisante pour réprimer la transcription. L'attachement covalent de SUMO à des facteurs de transcription inhiberait la transcription par recrutement de corépresseurs transcriptionnels. Les HDACs jouent un rôle important dans la répression mise en place par la SUMOylation, mais celui-ci est dépendant du contexte. Elles peuvent soit être recrutées par des protéines SUMOylées, soit être elles-mêmes modifiées, et peuvent aussi modifier des substrats entraînant un effet sur la SUMOylation (Gill, 2005).

Voici quelques exemples de recrutements d'HDACs impliquant la SUMOylation.

La région CRD1 (Cell cycle Regulatory Domain 1) de p300 est un domaine répresseur qui est modifié par SUMOylation sur deux Lysines cibles ce qui permet son interaction avec HDAC6 (Girdwood et al., 2003) (Bouras et al., 2005).

Le complexe NuRD, décrit précédemment, est modifié par SUMOylation sur les protéines p66 α et β . Ces protéines aident à la répression mise en place par d'autres membres de ce complexe : MBD2 et 3 ; et ceci requière leur SUMOylation. P66 α -SUMO interagit avec HDAC1 (Gong et al., 2006).

L'histone H4 est SUMOylée, ce qui aurait une fonction répressive puisqu'elle permet son interaction avec HDAC1 et la protéine de l'hétérochromatine HP1 γ (Shiio and Eisenman, 2003).

Comme nous venons de le voir, les HDACs peuvent être elles-mêmes SUMOylées. Les exemples décrits jusqu'à présent montrent que cette modification est nécessaire à l'activité de désacétylation.

Le récepteur aux androgènes AR, ainsi que quatre de ses co-régulateurs, sont SUMOylés.

SEN1 agit comme un activateur de la transcription dépendante de AR. Elle désSUMOyle HDAC1, ce qui met un frein à l'action de cette désacétylase et par là même augmente l'activité transcriptionnelle mise en place par la protéine AR (Cheng et al., 2004).

HDAC4 est modifiée par SUMO1, ce qui nécessite un domaine NLS (Nuclear Localisation Signal) intact. Son taux de SUMOylation *in vivo* est largement dépendant de sa capacité à former des agrégats par son domaine coiled coil N-terminal. Un mutant non SUMOylable voit son activité de désacétylation diminuée (Kirsh et al., 2002).

La SUMOylation de HDAC9 a été mise en évidence en même temps que sa caractérisation mais son effet n'est pas décrit (Petrie et al., 2003).

Le dernier rôle de ces protéines HDACs au sein de la voie de SUMOylation est le contrôle de cette modification à travers la désacétylation, voire même un contrôle direct par aide à la SUMOylation des cibles. Ceci est largement détaillé au sein du chapitre suivant.

- Activation transcriptionnelle

Malgré le rôle très important attribué à la SUMOylation dans la répression transcriptionnelle, il existe quelques exemples décrivant l'activité opposée.

Contrairement aux autres membres de sa famille p63 et p73, la SUMOylation de p53 contribue à son activation (Stehmeier and Muller, 2009). P53 est modifiée par SUMO1 sur sa Lysine 386 ce qui augmente son activité transcriptionnelle ; cette forme est accumulée dans la cellule après irradiation UV (Rodriguez et al., 1999) (Gostissa et al., 1999).

Une étude, contradictoire à d'autres comme il sera détaillé plus loin, montre que la protéine de liaison aux îlots CpG méthylés de l'ADN MBD1 est SUMOylée par la E3 ligase PIAS1. Ceci a comme conséquence l'inhibition de son interaction avec la méthylase SETDB1, responsable du dépôt des marques répressives H3K9 di et tri méthylées. Conformément au modèle établi par ces auteurs, cette modification par SUMOylation mène donc à l'inhibition de la répression d'un gène cible de MBD1, *p53BP2* (Lyst et al., 2006).

TCF4 (T Cell Factor 4), un facteur de transcription effecteur de la voie de signalisation Wnt (Wingless type), qui agit après interaction avec la β -caténine, est conjugué à SUMO1 via sa Lysine 297. La E3 ligase PIAS γ ainsi que la β -caténine activent TCF4 de manière synergique ; elles stimulent son activité transcriptionnelle (Yamamoto et al., 2003).

2) Stabilité génomique

La SUMOylation est un régulateur important de la recombinaison homologue (HR) chez la levure. L'ADN ribosomal (ADNr), constitué de séquences répétées, se situe dans le nucléole. L'activité du complexe Smc5-Smc6 supprime la formation de foyers nucléolaires de Rad52, une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN, ce qui assure la stabilité génétique du locus. La recombinaison de l'ADNr a lieu préférentiellement à des foyers de Rad52 en dehors du compartiment nucléolaire ; la SUMOylation de Rad52 est nécessaire à leur formation (Torres-Rosell et al., 2007). Il est également décrit que la SUMOylation de Rad52 la protège de la protéolyse et que cette forme SUMOylée se trouve aux sites de dommages à l'ADN (Eckert-Boulet and Lisby, 2009).

Le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base (BER pour Base Excision Repair) est initié par une glycosylase de l'ADN qui reconnaît et retire les bases aberrantes. L'une de ces enzymes est la TDG (Thymine DNA Glycosylase) qui excise les T (Thymine) et U (Uracile) des mésappariements G•T (G pour Guanine) et G•U en créant ainsi un site abasique AP qui va pouvoir être réparé par d'autres enzymes. La SUMOylation de cette glycosylase diminue son affinité pour le site AP. TDG SUMOylée n'a plus d'activité sur les mésappariements G•T, par contre cette activité est fortement augmentée sur les G•U (Hardeland et al., 2002). L'hypothèse d'un cycle de SUMOylation/déSUMOylation peut être formulée pour la réparation des mésappariements G•U : la protéine TDG se fixe à l'ADN et excise le U, elle est ensuite SUMOylée ce qui entraîne son décrochement du site AP, et enfin TDG est déSUMOylée permettant de nouveau la fixation à l'ADN (Johnson, 2004).

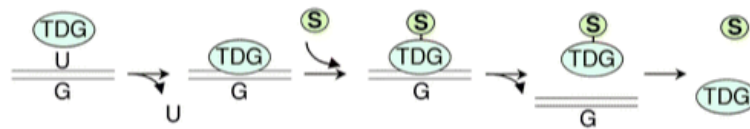


Figure 25 : Hypothèse de cycle de SUMOylation dans le cas de la réparation BER via la glycosylase TDG (Johnson, 2004).

3) Mitose/Méiose

La voie de SUMOylation est fortement impliquée dans la mitose en agissant à différents niveaux.

La Topoisomérase II est un déterminant essentiel de la structure et de la fonction des chromosomes. Elle agit en résolvant les problèmes topologiques inhérents à la recombinaison, la transcription, la réplication et la ségrégation de l'ADN. La SUMOylation paraît être requise pour l'accumulation de la Topoisomérase II aux centromères des cellules humaines (Lee and Bachant, 2009).

Chez la levure, les septines Cdc3p, 11p et Shs1p sont nécessaires à la cytokinèse (division du cytoplasme dans les dernières phases de la méiose et de la mitose pour former les cellules filles). Elles sont SUMOylées par la E3 ligase Siz1p pendant la phase M. La machinerie de transport nucléaire régule la SUMOylation des septines en contrôlant l'accès de Siz1p et de l'isopeptidase de SUMO Ulp1. Siz1p est nucléaire, sa phosphorylation lors de l'anaphase entraîne sa relocalisation dans le cytoplasme et son accumulation à l'anneau de septines (Makhnevych et al., 2007).

RanGAP1 est une petite GTPase de type Ras impliquée dans la régulation du transport nucléo-cytoplasmique. SUMO1 est nécessaire à la localisation de cette protéine. Une fraction de RanGAP1 est ciblée au corps du fuseau mitotique ainsi qu'à l'extrémité positive des microtubules du kinétochore. Ceci pourrait altérer localement la concentration de la forme active de Ran (Ran-GTP) afin d'aider à la stabilisation des microtubules. La conjugaison de SUMO1 à RanGAP1 est restreinte au groupe des métazoaires ; ceci pourrait donc refléter son rôle particulier dans la localisation de RanGAP1 pendant l'assemblage du fuseau mitotique en absence d'enveloppe nucléaire intacte (Joseph et al., 2002).

L'implication de la voie de SUMOylation dans la méiose a été décrite chez la levure. Chez *S.cerevisiae* la méiose se traduit par la sporulation. Zip3, une E3 ligase, permet l'initiation du complexe synaptonémal (complexe protéique permettant l'association des chromosomes homologues entre eux lors de la prophase de la première division de méiose). Zip1 fait partie intégrante de ce complexe et connecte les filaments transverses aux chromosomes ou aux éléments latéraux, en interagissant le long de ces éléments avec les produits conjugués à SUMO. La modification SUMO dépendante de Zip3 est requise pour la formation du complexe synaptonémal ; il y a formation de chaînes polymériques le long des chromosomes méiotiques en milieu de prophase qui sont requises pour l'assemblage du complexe (Cheng et al., 2006).

4) Stabilité protéique

SUMO étant apparentée à l'Ubiquitine et ciblant les mêmes résidus, sa première fonction prédite fut la stabilisation protéique par compétition avec l'Ubiquitine en protégeant les cibles de la dégradation par le protéasome. C'est en effet ce qui a été décrit pour les protéines Smad4 et I κ B α (Lin et al., 2003) (Desterro et al., 1998).

Cependant, un lien direct entre la SUMOylation et la dégradation protéique est mis en place par les STUbLs (Perry et al., 2008). Chez l'Homme, une seule de ces protéines a été décrite jusqu'à présent : RNF4 qui, via son motif SIM, reconnaît les protéines SUMOylées, les modifie par ubiquitination grâce à un domaine de type RING, et entraîne ainsi leur dégradation (Sun et al., 2007).

5) Transport nucléaire et transduction du signal

Certains récepteurs sont décrits comme étant SUMOylés, impliquant cette modification dans la transduction du signal, qu'il soit cytoplasmique ou nucléaire.

RanGAP1 (Ran GTPase-activating protein 1) a été la première protéine humaine à avoir été décrite comme modifiée par SUMOylation. Elle est requise pour l'import de protéines nucléaires. Cette protéine existe sous deux formes, l'une de 70 et l'autre de 90 kda. La majeure fraction de celle de 90 kda se trouve à l'enveloppe nucléaire. Il s'avère que cette forme est modifiée par SUMOylation et que cette modification est nécessaire à l'importation. Elle permet l'interaction avec RanBP2 (Ran-GTP-binding protein 2), une nucléoporeine composant les fibres cytoplasmiques du pore nucléaire (Mahajan et al., 1997) (Matunis et al., 1998).

6) Réponse au stress

La SUMOylation globale varie beaucoup en réponse à différents stress. Le stress oxydatif entraîne une augmentation ou une diminution de la SUMOylation selon les protéines et les doses utilisées ; le stress hypoxique est à l'origine d'une SUMOylation protéique globale ; quant au stress génotoxique il augmente la SUMOylation de certaines protéines telles que Rad52 et diminue celle d'autres comme hRIP1 β (Tempe et al., 2008).

De manière plus spécifique, la SUMOylation est impliquée dans l'apoptose puisqu'elle est requise pour la mort cellulaire programmée en réponse aux inhibiteurs d'HDACs, Trichostatine A et Depsipeptide (Hayakawa et al., 2008). La modification par SUMO1 de p53 est nécessaire pour qu'elle exerce pleinement son activité apoptotique (Muller et al., 2000). La Sérine/Thréonine kinase HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2) est induite en réponse aux dommages à l'ADN ce qui aboutit à la mort cellulaire. Cette kinase est recrutée aux corps nucléaires et phosphoryle PML sur plusieurs Lysines cibles. Ces modifications contribuent à la SUMOylation de PML induite par les dommages à l'ADN. PML SUMOylée agit en synergie avec HIPK2 pour l'induction de la mort cellulaire (Gresko et al., 2009).

D'autre part, la surexpression de SUMO2/3 induit la sénescence, dépendante de p53 et pRb. D'ailleurs, le stress oxydatif, souvent à l'origine de la sénescence cellulaire, entraîne une augmentation de la SUMOylation de p53 (Li et al., 2006).

IV. Relations SUMOylation – autres modifications

Après la découverte de la modification des protéines par SUMOylation, il est vite apparu qu'elle se trouvait en relation avec certaines autres modifications post-traductionnelles. Ceci ouvre l'horizon des champs d'action de SUMO car ces relations s'avèrent être complémentaires ou exclusives, au sein ou non de la même protéine.

Le dialogue entre SUMO et les autres modifications émerge comme un mécanisme commun qui permet le contrôle complexe de l'activité transcriptionnelle (Verger et al., 2003).

Un niveau de régulation peut encore être ajouté si l'on prend en compte le fait que les enzymes de conjugaison/déconjugaison de SUMO puissent elles-mêmes être modifiées, ce qui pourrait entre autres altérer leur capacité d'interaction avec des protéines cibles (Bossis and Melchior, 2006).

A. SUMOylation – Méthylation

Jusqu'à présent aucune relation n'a été décrite entre la SUMOylation et la méthylation au sein de la même protéine. Par contre, SUMO ayant un rôle dans la répression transcriptionnelle, il paraît évident que ce lien existe entre une protéine SUMOylée et la méthylation des histones.

La recherche de résidus conservés entre les différentes formes de SUMO a permis de mettre en évidence, par mutations ponctuelles, les résidus importants dans la répression transcriptionnelle mise en place par SUMO2 (Rosendorff et al., 2006). Les auteurs ont utilisé ces mutants ainsi que la forme sauvage dans le but de discriminer les protéines candidates répressives interagissant avec SUMO2. Ce crible a permis d'identifier, entre autres, l'histone méthyltransférase SETDB1 (SET Domain Bifurcated 1) et la déméthylase LSD1 (Lysine-Specific Demethylase 1), mettant ainsi en évidence un lien direct entre SUMO et la méthylation des histones (Rosendorff et al., 2006).

Plusieurs études établissent un lien entre la SUMOylation et SETDB1.

La création d'un transgène contenant les éléments de réponse à Gal4 intégré dans la chromatine a été utilisée afin d'étudier la différence d'effet entre Gal4-Sp3 et Gal4-Sp3K551R non SUMOylable. Grâce à ce système, cette équipe a pu mettre en évidence que la

SUMOylation du facteur de transcription Sp3 (Specificity Protein 3) est responsable de l'établissement d'une structure hétérochromatique grâce au recrutement de SETDB1 et SUV4-20H (une protéine du groupe *Polycomb*) et donc de la mise en place des marques répressives H3K9Me2, H3K9Me3 et H4K20Me3 (Stielow et al., 2008).

Il a également été montré que la SUMOylation du corépresseur KAP1 (KRAB domain-Associated Protein 1) est requise pour le recrutement de SETDB1 aux promoteurs cibles, via son motif SIM, afin d'établir les marques répressives de la chromatine. La SUMOylation de KAP1 augmente l'activité intrinsèque HMTase de SETDB1 (Ivanov et al., 2007).

KAP1 contient un bromodomaine qui reconnaît les Lysines acétylées et un domaine PHD (Prolyl Hydroxylase Domain) qui lie les histones méthylés. Le domaine PHD, qui est proche du domaine RING finger des E3 ligases, est requis pour la SUMOylation du bromodomaine adjacent. Il interagit avec Ubc9 (Ivanov et al., 2007).

Un lien pourrait certainement être établi entre la SUMOylation et la méthylation de l'ADN puisque MBD1 (Methyl-CpG-Binding Domain 1), protéine de liaison aux îlots CpG méthylés de l'ADN, a été décrite comme étant SUMOylée au cours de deux études quelque peu contradictoires (Uchimura et al., 2006) (Lyst et al., 2006).

La SUMOylation de MBD1 permet une interaction plus stable avec son partenaire MCAF1 (MBD1-containing Chromatin-Associated Factor 1). Les voies SUMO sont impliquées dans l'ancrage de MCAF1 et sont critiques pour la méthylation de H3K9 et la mise en place des protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1) à l'hétérochromatine contenant MBD1 (Uchimura et al., 2006).

Une étude publiée deux mois plus tard met en évidence que la SUMOylation de MBD1 empêche le recrutement de SETDB1, puisque cette protéine interagit au niveau du site de SUMOylation. En fait, SETDB1 serait en compétition avec les E3 ligases PIAS1 et 3 pour l'interaction avec MBD1 et protégerait ainsi MBD1 de la SUMOylation. En accord avec leur modèle, ces auteurs ont montré que la forme non SUMOylable de MBD1 réprime mieux un gène cible endogène et que MBD1 SUMOylée, bien que capable de lier l'ADN méthylé, n'est pas capable de recruter SETDB1 à la chromatine (Lyst et al., 2006).

Ces deux études mènent à penser à un mécanisme complexe pas encore totalement élucidé, où l'explication se trouve peut être en lien avec une autre modification post-traductionnelle qui agirait sur l'effet de la SUMOylation de MBD1.

B. SUMOylation - Phosphorylation

1) Les sites définis

Alors qu'aucun site spécifique n'a été mis en évidence lorsque la SUMOylation et la phosphorylation sont mutuellement exclusives, il n'en est pas de même quand ces deux modifications sont complémentaires.

Hietakangas et ses collaborateurs ont mis en évidence un site $\Psi KxExxSP$ au sein duquel la phosphorylation de la Sérine est dirigée par la Proline adjacente, puisque celle-ci est indispensable. Quant à cette phosphorylation, elle influence la SUMOylation de la Lysine en amont (Hietakangas et al., 2003). Cette découverte a mené cette équipe à l'étude plus générale de ce site. Dans SwissProt le site $\Psi KxExxSP$ (conservé entre l'Homme et la souris) est trouvé au sein de 48 protéines humaines dont 71% sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle (Hietakangas et al., 2006). L'étude de trois de celles-ci (HSF1, GATA1 et MEF2A) montre que la SUMOylation du motif requiert sa phosphorylation. Ceci a donc mené à la caractérisation d'un motif commun qu'ils ont baptisé PDSM pour Phosphorylation Dependent SUMOylation Motif (Hietakangas et al., 2006).

La phosphorylation étant le résultat de différentes voies de signalisation intracellulaires, le PDSM semble donc être un motif composite capable d'intégrer différents signaux cellulaires et de les convertir en action basée sur la SUMOylation.

Certaines protéines n'ont pas le résidu Proline ; par exemple pour c-Jun le motif est du type $\Psi KxExxS/T$, la SUMOylation est-elle réellement dépendante de la phosphorylation dans ce cas ? (Yang and Gregoire, 2006)

Il y a souvent une surreprésentation de résidus chargés négativement 10 acides aminés en aval du site de SUMOylation avec un point « chaud » pour les résidus 3 à 6 (Liu et al., 2006b). Au sein du PDSM, la Sérine phosphorylée peut être remplacée par un acide aminé chargé négativement : c'est la charge négative en +3 qui est importante, cela fonctionne également si cet acide aminé est placé en +6. Un nouveau motif peut donc être déduit : NDSM pour Negatively charged amino acid-Dependent SUMOylation Motif (Liu et al., 2006b) (Anckar and Sistonen, 2007).

La différence principale entre ces deux motifs est le caractère transitoire de la charge négative du PDSM.

2) Agonisme Phosphorylation – SUMOylation

Le PDSM a été découvert chez la protéine HSF1 (Heat Shock transcription Factor 1), un facteur de transcription régulant les gènes de choc thermique.

En réponse au stress cette protéine est phosphorylée sur deux Sérines cibles proches l'une de l'autre : S307 puis S303 (Hilgarth et al., 2003). Cette forme phosphorylée se lie aux HSE (Heat Shock Elements) (Hietakangas et al., 2003).

La phosphorylation de l'une des deux Sérines est indispensable à la capacité de HSF1 à être SUMOylée sur sa Lysine 298. La kinase ERK2 entraîne la SUMOylation de HSF1 et cet effet passe par la Sérine 307 (Hilgarth et al., 2003). Ceci laisse donc penser que différents signaux peuvent mener à la SUMOylation de cette protéine à travers deux résidus phosphorylables.

Cette SUMOylation est transitoire puisqu'il est montré que le stress induit une colocalisation transitoire de HSF1 et SUMO1 aux mêmes compartiments subnucléaires. La localisation de HSF1 à ces granules est indépendante du statut de phosphorylation de la Sérine 303, mais cette phosphorylation est requise pour la colocalisation transitoire HSF1-SUMO1 (Hietakangas et al., 2003).

Comme pour beaucoup d'autres protéines, la SUMOylation a pour effet l'inhibition de l'activation transcriptionnelle. Par contre, le mécanisme n'est pas connu et la littérature n'est pas très claire puisqu'il est décrit que la SUMOylation de HSF1 sur la Lysine 298 active sa capacité de liaison à l'ADN (Hilgarth et al., 2003), mais également que la forme non SUMOylable est capable de lier les HSE et d'induire l'expression de HSP70 (Hietakangas et al., 2003).

Il a également été mis en évidence pour cette protéine que son domaine Leucine Zipper 4 régule négativement sa SUMOylation (Hilgarth et al., 2003).

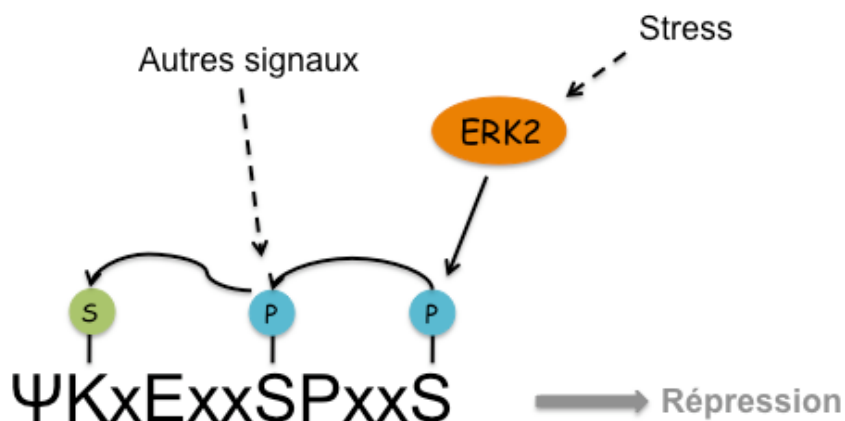


Figure 26 : Agonisme phosphorylation – SUMOylation à travers un motif PDSM, l'exemple de HSF1.

Le PDSM a également été mis en évidence chez PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activator Receptor γ), une protéine ayant un rôle clé dans la différenciation des adipocytes. Dans ce cas, ce motif pourrait réguler l'association de cette protéine avec le domaine d'interaction WW de partenaires tels que TAZ et YAP (Yang and Gregoire, 2006).

3) Antagonisme Phosphorylation – SUMOylation

Dans la presque totalité des cas recensés, ces deux modifications sont mutuellement exclusives, et c'est la phosphorylation qui empêche ou annule la SUMOylation.

Le complexe AP1 (Adapin complex 1, responsable du transport entre le trans-Golgi Network (TGN) et les endosomes), qui comprend entre autres les protéines c-Fos et c-Jun, est régulé par SUMOylation.

C-Fos est SUMOylée sur sa Lysine 265. Un choc thermique entraîne sa désSUMOylation, qui est cependant rétablie dès un retour à la température initiale. Par ailleurs, la phosphorylation de la Thréonine 232 est antagoniste à la SUMOylation et est responsable d'une superactivation de l'activité transcriptionnelle de cette protéine (Bossis et al., 2005).

C-Jun, quant à elle, est SUMOylée sur ses Lysines 229 et 257. Comme cela a été décrit par ailleurs, la mutation de la K229 augmente l'activité transactivatrice de l'homodimère c-Jun (Müller et al., 2000) ; cet effet est encore plus important lors de la mutation des deux Lysines cibles (Bossis et al., 2005).

C-Fos est préférentiellement SUMOylée quand elle se trouve en hétérodimère avec c-Jun (Bossis et al., 2005).

Le motif répresseur R de Elk-1 (facteur de transcription de la famille ETS) supprime son activité transcriptionnelle : les résidus K249 et E251 sont importants ; ils constituent en effet un site de SUMOylation. D'autre part, la signalisation ERK phosphoryle Elk-1. Les signalisations ERK et SUMO sont antagonistes pour le contrôle de l'activité transactivatrice de Elk-1 puisque les inhibiteurs de la signalisation SUMO et les activateurs de celle de ERK agissent en synergie (Yang et al., 2003).

La modification SUMO1 de p53 sur sa Lysine 286 est nécessaire à son activité pro-apoptotique. Il n'y a pas de régulation SUMOylation/ubiquitination, par contre l'hyperphosphorylation de p53 empêche l'apparition des formes SUMOylées et ubiquitinées

(Muller et al., 2000). La Sérine 20 de p53 est phosphorylée par la kinase du point de contrôle de la phase S Chk2 en réponse aux dommages à l'ADN, ceci entraîne une diminution de la SUMOylation en affectant l'interaction de p53 avec Ubc9 (Lin et al., 2004).

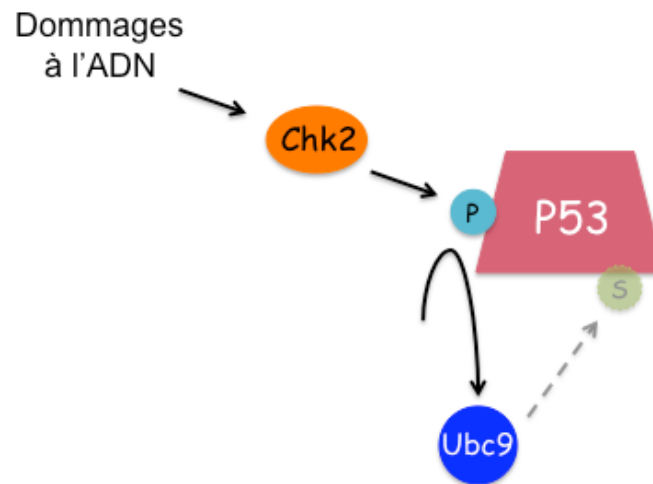


Figure 27 : Antagonisme phosphorylation – SUMOylation, l'exemple de p53.

KAP1 est SUMOylée sur plusieurs Lysines : 554, 779 et 804. Cette SUMOylation diminue après un traitement à la doxorubicine qui entraîne la mort cellulaire. La désSUMOylation de KAP1 atténue son activité de répression transcriptionnelle sur ses gènes cibles *p21* et *Gadd45α* (Growth arrest and DNA damage clone 45) (Li et al., 2007). La kinase de réponse aux dommages doubles brins de l'ADN ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) est rapidement et transitoirement phosphorylée après traitement à la doxorubicine, ce qui l'active. Ceci a comme conséquence la phosphorylation de KAP1 sur sa Sérine 824 et sa désSUMOylation, ce qui induit donc la transcription de *Gadd45α*. Par contre, dans des conditions basales, c'est l'isopeptidase SENP1 qui désSUMOyle et permet la phosphorylation de KAP1 (Li et al., 2007).

La compétition SUMOylation – phosphorylation a également été décrite au sein de récepteurs nucléaires.

PR A et B (Progesterone Receptor) sont SUMOylées sur leur Lysine 388. Cette modification est dépendante du ligand. L'activation de facteurs de croissance via la signalisation des kinases altère rapidement la SUMOylation de PR B attaché à son ligand ; le récepteur est phosphorylé ce qui entraîne une désSUMOylation et permet d'exhiber une activité transcriptionnelle (Daniel et al., 2007).

SF1 (Steroidogenic Factor 1) est un récepteur nucléaire orphelin. La phosphorylation de sa Sérine 203 entraîne la liaison de coactivateurs et augmente son potentiel transactivateur. Cette protéine est SUMOylée sur sa Lysine 194, ce qui atténue son activité transcriptionnelle. SF1 peut être SUMOylée indépendamment du statut de phosphorylation de S203. A l'inverse, l'occupation du promoteur d'un gène cible est augmentée pour les formes déficientes en SUMOylation (K194R) ; ces mutants sont davantage phosphorylés car interagissent mieux avec les enzymes de phosphorylation ainsi qu'avec les coactivateurs (Yang et al., 2009). Cette protéine constitue le premier exemple d'interaction non réciproque entre la SUMOylation et la phosphorylation pour lequel c'est la SUMOylation qui joue un rôle sur la phosphorylation et non le contraire.

4) Et complexifions un peu...

PML (Promyelocytic Leukemia protein) contrôle la progression du cycle cellulaire, la sénescence et la mort cellulaire. Dans les cellules normales, cette protéine est localisée dans les NBs (Nuclear Bodies) où elle s'accumule avec plus de 70 types de protéines impliquées dans la suppression tumorale, l'apoptose, la régulation de l'expression des gènes, la réponse anti-virale et la réparation de l'ADN. PML exerce sa fonction en régulant celle des partenaires formant le corps des NBs (Johnson, 2004).

PML et Sp100 se trouvent dans les corps nucléaires pendant toute l'interphase et ceci est dû à leur SUMOylation. La déconjugaison de SUMO1 de ces protéines et l'apparition de nouvelles modifications de PML (présümées être des formes phosphorylées) sont des événements rapides et confinés à la période courte de mitose (Everett et al., 1999).

Au sein de ces corps nucléaires PML recrute HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2). Cette kinase est induite par les dommages à l'ADN et phosphoryle PML sur ses Sérines 8, 36 et 38, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la stabilité protéique et l'induction de sa SUMOylation, et ce qui contribue à l'induction de la mort cellulaire (Gresko et al., 2009).

PML apparaît donc comme ayant des formes phosphorylées antagonistes et d'autres agonistes à sa SUMOylation.

IFN γ (Interferon γ) a des fonctions importantes dans la réponse immunitaire et induit des gènes de réponse largement dépendants de STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1). La stimulation IFN γ entraîne l'activation de la voie des MAPK qui

phosphoryle STAT1 sur sa Sérine 727, permettant son interaction avec PIAS1 et sa SUMOylation (Vanhatupa et al., 2008).

Par contre, la SUMOylation de STAT1 sur sa Lysine 703 inhibe sa phosphorylation sur sa Tyrosine 701 (qui est pourtant elle-même stimulée par IFN γ) (Zimnik et al., 2009).

Ceci ouvre donc la possibilité que, selon le site phosphorylé, la SUMOylation de la K703 puisse être stimulée ou inhibée, offrant la possibilité d'une régulation complexe.

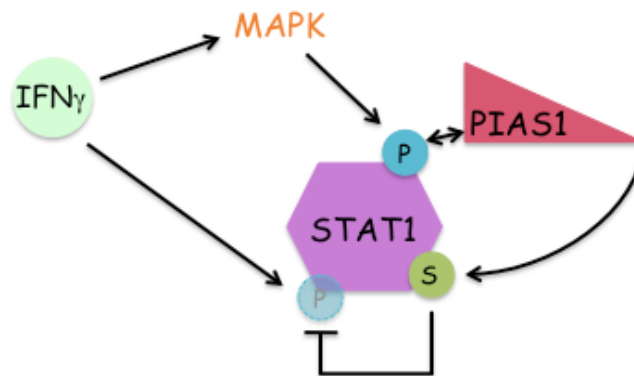


Figure 28 : Agonisme et antagonisme phosphorylation – SUMOylation au sein de la même protéine, l'exemple de STAT1.

C. SUMOylation – Ubiquitination

1) En lien avec la dégradation protéique

Un lien entre la SUMOylation et l'ubiquitination a été découvert chez la levure grâce aux protéines Rfp1 et 2 (RING-finger protein 1 et 2), car elles contiennent en N-terminal un domaine SIM d'interaction non covalente avec SUMO et en C-terminal un domaine RING responsable d'une activité E3 ligase pour l'Ubiquitine (Sun et al., 2007). Elles n'ont elles-mêmes pas d'activité E3 fonctionnelle mais fonctionnent en hétérodimère avec la protéine Slx8 (Synthetic lethal x 8) ; cette interaction RING-RING permet l'activité « Ubiquitine-ligase ».

L'orthologue humain de ces protéines est RNF4 et s'avère être une chimère fonctionnelle des hétérodimères de levure (Sun et al., 2007). La fonction conservée des protéines de la famille RNF4 pourrait être de cibler les protéines SUMOylées pour entraîner leur dégradation via l'Ubiquitine.

Ces protéines ont été baptisées STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases). L'Ubiquitination mise en place par ces protéines chez la levure promeut la dégradation par le protéasome des conjugués SUMO. L'accumulation des conjugués SUMO au sein des mutants STUbLs est davantage au détriment de la croissance cellulaire et de la stabilité génomique que l'hypoSUMOylation. Ces STUbLs ouvrent de nouvelles voies pour la détermination des rôles et la régulation de SUMO dans la transcription, la réparation de l'ADN, la stabilité génomique, et donc au sein des maladies humaines (Heideker et al., 2009).

Deux études concomitantes ont mis en évidence le rôle de RNF4 dans la dégradation de PML et PML-RAR α via l'arsenic (Lallemand-Breitenbach et al., 2008) (Tatham et al., 2008).

Les patients atteints de leucémie promyélocytaire aigüe ont été initialement traités avec de l'ATRA (All-*Trans* Retinoic Acid) combiné à de la chimiothérapie. Malgré un fort pourcentage de rémission une catégorie de patients développe une résistance à l'ATRA. Le trioxide d'arsenic (As₂O₃), une ancienne tradition de la médecine chinoise, a été prouvé comme étant une drogue efficace pour le traitement de ces patients. Jusqu'à récemment et malgré les différents travaux effectués pour comprendre son fonctionnement, on ne connaissait pas le rôle exact de ce « poison » (Zhu et al., 2002).

L'arsenic augmente la SUMOylation de PML-RAR α , ce qui résulte en son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. L'arsenic induit l'agrégation de RNF4 aux corps nucléaires PML ; la SUMOylation qui cible le catabolisme de PML a lieu dans ces corps nucléaires. La surexpression de RNF4 entraîne la disparition des corps nucléaires PML normaux mais pas de ceux de PML non SUMOylable (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). A l'inverse, le siRNA RNF4 ainsi que l'inhibition du protéasome entraînent l'accumulation de SUMO et de PML dans ces corps nucléaires (Tatham et al., 2008).

A l'inverse, puisque ces deux modifications ciblent des Lysines, la SUMOylation pourrait entrer en compétition avec l'ubiquitination, empêchant ainsi la dégradation mise en place par l'Ubiquitine.

C'est ce qui a été décrit pour le médiateur central de la signalisation du TGF β : l'activateur transcriptionnel Smad4 (Lin et al., 2003). La SUMOylation entre en compétition avec l'ubiquitination sur deux Lysines se trouvant autour du NES (Nuclear Export Signal). La SUMOylation a un effet positif sur l'inhibition de croissance et les fonctions transcriptionnelles de Smad4, dû essentiellement à une augmentation de la stabilité de cette protéine. SUMO1 apparaît augmenter la rétention et/ou la stabilité de Smad4 dans le noyau, et l'inhibition

d'expression de Ubc9 reverse l'effet du TGF β sur l'accumulation de cette protéine (Lin et al., 2003).

L'insuffisance de SUMOylation pourrait donc servir de mécanisme aux cellules pour échapper au contrôle de l'inhibition de croissance du TGF β pendant le développement cancéreux.

2) Rôles différents de la dégradation protéique

Une étude menée chez la levure a permis de mettre en évidence un antagonisme SUMOylation-ubiquitination dans des mécanismes de réparation de l'ADN (Hoegge et al., 2002).

RAD6 est une enzyme de conjugaison de l'Ubiquitine et une protéine centrale dans la réparation post-réplivative de l'ADN. Un de ses substrats est PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui encercle l'ADN en formant un anneau trimérique autour de ses brins et fonctionne comme un facteur de processivité pour les polymérases.

PCNA est SUMOylée sur deux Lysines ; ces modifications sont régulées au cours du cycle cellulaire et précèdent l'augmentation de PCNA pendant la phase S. La K164 est également la cible de l'Ubiquitine et celle-ci est essentielle pour la réparation de l'ADN post-réplivative. La SUMOylation de cette Lysine empêche non seulement son ubiquitination mais inhibe également la réparation de l'ADN PCNA-dépendante. D'autre part, la SUMOylation K127 semble inhiber le processus de réparation de l'ADN (Hoegge et al., 2002).

Une étude menée quelques années plus tard, toujours chez la levure, a mis en évidence le fait que la SUMOylation de PCNA augmente son affinité pour l'hélicase Srs2p. Elle recrute cette hélicase à la fourche de réplication, permettant ainsi la tolérance de cette fourche en empêchant le recrutement de la protéine de réparation Rad51 et donc les recombinaisons homologues, laissant l'ADN libre pour le « processing » (Papouli et al., 2005).

Par contre, PCNA monoubiquitinée recrute la polymérase η qui tolère les dommages à l'ADN. L'ubiquitination de PCNA contribue à la progression de la réplication de l'ADN avec succès en présence d'agents endommageant l'ADN (Ulrich et al., 2005).

SUMO et Ubiquitine ne seraient donc pas antagonistes dans la tolérance aux dommages à l'ADN mais coopéreraient dans l'élaboration d'une réponse appropriée permettant de temporiser la fourche de réplication.

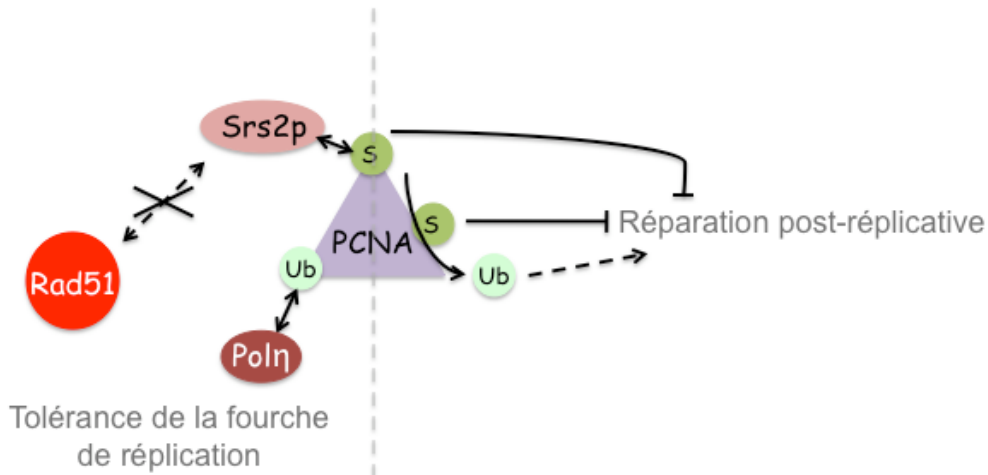


Figure 29 : Coopération et compétition ubiquitination – SUMOylation au sein de la même protéine, l'exemple de PCNA.

SUMO et Ubiquitine ont été montrées comme coopérant dans l'export nucléaire.

Un des régulateurs les plus importants de p53 est MDM2 (Mouse Double Minute 2), une E3 Ubiquitine-ligase à domaine RING qui ubiquitine p53. P53, qui est une protéine exclusivement nucléaire, devient cytoplasmique lorsqu'elle est ubiquitinée. Elle contient six Lysines dans son domaine C-terminal, dont seule K186 est SUMOylable. Une des fonctions majeures des modifications C-terminales de cette protéine dans l'export nucléaire est le relargage de MDM2. La SUMO E3 ligase PIAS γ est capable de promouvoir l'export de p53, mais seulement en présence de la E3 Ubiquitine-ligase. PIAS γ et MDM2 mènent donc à l'exportation de p53 à travers sa SUMOylation et son ubiquitination (Carter et al., 2007). Le fonctionnement exact de l'export via ses deux modifications n'étant pas encore élucidé, l'explication réside peut-être dans une ou plusieurs modifications supplémentaires.

Un autre type de protéines qui peuvent être SUMOylées et ubiquitinées sont les histones. La SUMOylation est liée à la répression et l'ubiquitination a initialement été décrite comme étant concomitante à une chromatine active. Cependant il n'est pas décrit d'évidence de compétition et le mécanisme par lequel SUMO entraîne la répression transcriptionnelle semble être indépendant du système Ubiquitine (Ulrich, 2005).

D. SUMOylation – Ubiquitination – Phosphorylation

Les facteurs de transcription de la famille NF κ B sont un point important de convergence pour plusieurs systèmes de transduction du signal qui régulent des gènes critiques pour le développement, les réponses immunitaires, la migration cellulaire et l'apoptose.

L'activation de NF κ B est mise en place par l'ubiquitination suivie de la dégradation de I κ B α , permettant ainsi la libération de NF κ B et sa migration dans le noyau. L'Ubiquitine est conjuguée sur la Lysine 21 et nécessite un signal préalable induit par la phosphorylation des Sérines 32 et 36 par le complexe IKK (I κ B Kinase). Cette K21 est également la cible d'une SUMOylation qui génère une forme de I κ B α résistante à la dégradation. La phosphorylation empêche la SUMOylation (Desterro et al., 1998).

Le complexe IKK contient deux sous-unités catalytiques IKK α /1 et β /2, une sous-unité régulatrice IKK γ /NEMO (NF κ B essential modulator) et une sous-unité qui fait office de squelette, EKKS.

Les agents endommageant l'ADN induisent une conjugaison de SUMO1 à NEMO, celle-ci est nécessaire à son ubiquitination puis à l'activation de NF κ B. Seules les formes de NEMO non liées à IKK peuvent être SUMOylées, ce qui entraîne leur migration vers le noyau. ATM, une kinase activée par phosphorylation suite aux cassures double brins de l'ADN (DSBs), régule l'ubiquitination, mais pas la SUMOylation, de NEMO pour permettre la signalisation NF κ B (Huang et al., 2003).

ATM phosphoryle les sites Sérine-Glutamine ou Sérine-Thréonine. La Sérine 85 et la Glutamine 86 de NEMO sont requises pour l'activation de NF κ B induite par les DSBs, la mutation S85A diminue l'ubiquitination de NEMO mais pas sa SUMOylation et empêche son exportation nucléaire. Une petite fraction d'ATM activée est exportée du noyau de manière dépendante de NEMO-Ub, ceci permet l'association et l'activation de IKK et est également important pour l'activation de NF κ B (Wu et al., 2006).

Un siRNA dirigé contre PIAS γ bloque la SUMOylation de NEMO ainsi que la phosphorylation de sa Sérine 85. L'interaction de NEMO avec PIAS γ ainsi que celle avec IKK2 s'effectue via sa région N-terminale, ces deux interactions sont mutuellement exclusives. NEMO-PIAS γ se trouve dans la fraction nucléaire tandis que NEMO-IKK2 est localisée dans la fraction cytoplasmique. Le stress oxydant peut être critique pour l'interaction PIAS γ -NEMO et la SUMOylation de NEMO après exposition à certains agents endommageant l'ADN (Mabb et al., 2006).

L'activation du complexe IKK est dépendante de NEMO et résulte en la phosphorylation par IKK1 et 2 de I κ B, entraînant sa polyubiquitination via les Lysine 48 de l'Ubiquitine et sa dégradation par le protéasome. NEMO agit donc comme une interface de liaison pour les régulateurs de IKK mais est également un site de modifications post-traductionnelles complexes (Sebban et al., 2006).

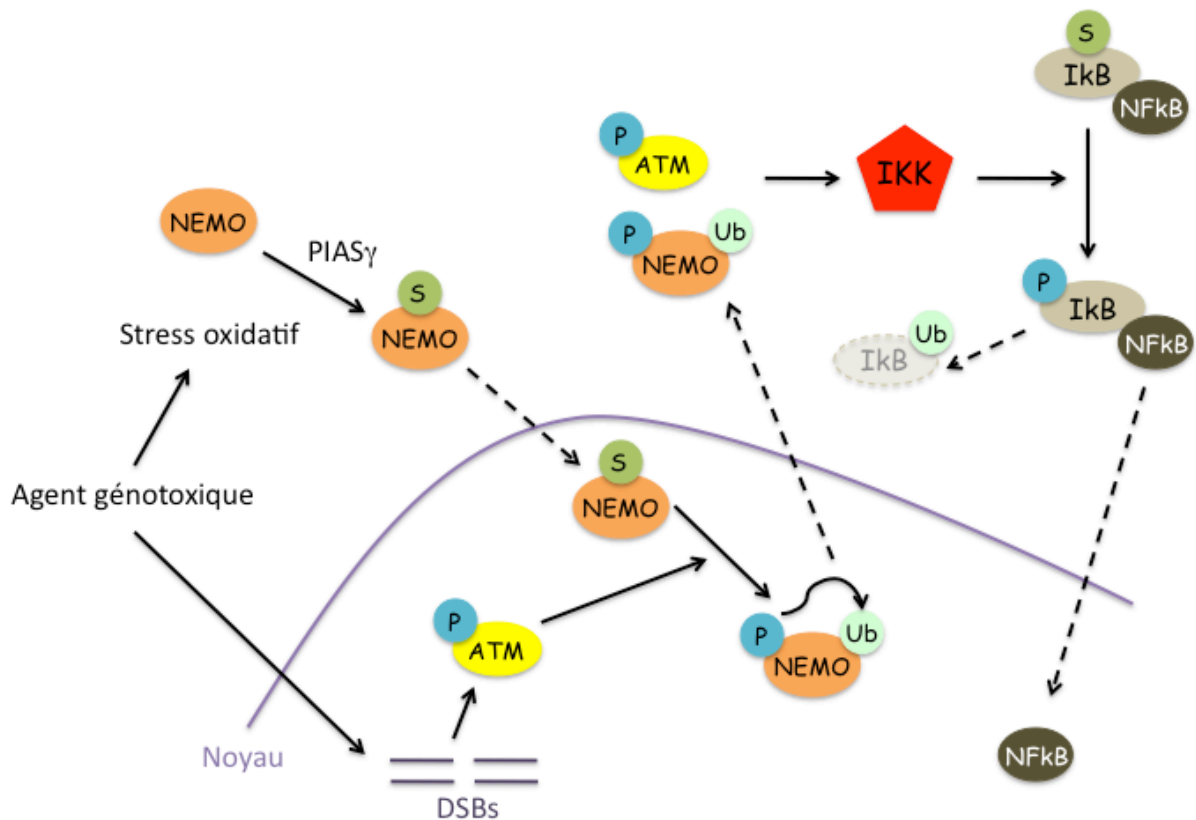


Figure 30 : Interrelations SUMOylation – Ubiquitination – Phosphorylation, l'exemple de la voie NF κ B.

Il existe d'autres cas de liens entre la SUMOylation, l'ubiquitination et la phosphorylation mais les mécanismes mis en jeu ont été beaucoup moins bien compris.

Le facteur de transcription Sp1 est la cible d'une permutation moléculaire contrôlée par compétition entre SUMOylation (responsable de la répression) et ubiquitination. La phosphorylation de sa Sérine 7 entraîne la désSUMOylation de sa Lysine 16 et promeut son ubiquitination. Sp1 SUMOylée est résistante au clivage protéolytique et à la dégradation (Spengler et al., 2008).

Un autre exemple concerne la maturation par clivage de NF κ B p100 en p52. La SUMOylation basale de p100 est un pré requis pour sa phosphorylation, qui elle-même est nécessaire à ce

clivage. La polyubiquitination de p100 étant essentielle à ce processus, la conjugaison de SUMO contrôle donc l'action dépendante de l'Ubiquitine (Vatsyayan et al., 2008).

Le facteur de transcription de la famille ETS PEA3 est SUMOylé sur trois Lysines : K222, K256, et K96 qui se trouve au sein d'un motif PDSM. La signalisation MAPK via ERK augmente les taux de PEA3 SUMOylée ; ces formes paraissent plus instables et les conjugués multi-SUMO de plus hauts poids moléculaires sont particulièrement sensibles car détectables uniquement après inhibition du protéasome. La SUMOylation de PEA3 est requise pour sa poly-ubiquitination. Cette SUMOylation est un déterminant moléculaire à sa capacité transactivatrice (Guo and Sharrocks, 2009).

E. SUMOylation – Acétylation

Sp3 est un facteur de transcription ubiquitaire qui peut soit activer soit réprimer la transcription par compétition avec l'activateur transcriptionnel Sp1 ou par répression active. Son activité transcriptionnelle dépend du contexte et est influencée par la structure des promoteurs ainsi que par le type cellulaire.

Sp3 contient un domaine inhibiteur constitué notamment d'une Lysine essentielle à son activité, acétylable par CBP (Braun et al., 2001). Ce même domaine est SUMOylé et cette modification est également nécessaire à la répression transcriptionnelle (Ross et al., 2002) (Sapetschnig et al., 2002). Le mutant de Sp3 non SUMOylable mais portant une molécule de SUMO greffée ailleurs sur la protéine rétablit la fonction répressive, suggérant donc un rôle de SUMO comme plate-forme pour le recrutement de corépresseurs (Valin and Gill, 2007).

Les modifications par acétylation et SUMOylation de Sp3 sont forcément exclusives l'une par rapport à l'autre puisque concernant la même Lysine ; cependant aucune étude ne met ce point en avant. Elles paraissent en tout cas avoir la même fonction, ce qui pourrait suggérer que la perte d'une modification puisse être remplacée par l'autre sans altérer la fonction de ce domaine.

PML est acétylée par p300 sur deux Lysines de son domaine C-terminal (487 et 515). Cette forme est préférentiellement SUMOylée. Ces deux modifications sont requises dans l'apoptose mise en place par des inhibiteurs de HDACs (Hayakawa et al., 2008).

Il existe également un lien entre la SUMOylation et l'acétylation mais sur des protéines différentes.

L'histone désacétylase de classe III SIRT1 est SUMOylée sur sa Lysine 734. Cette modification est nécessaire à son activité désacétylase, que ce soit sur p53 ou sur H4K16. Les stress génotoxiques diminuent son taux de SUMOylation. Il est en effet observé une augmentation d'interaction avec la désSUMOylase SENP1, ce qui entraîne une augmentation de la mort cellulaire (Yang et al., 2007).

La désSUMOylation de SIRT1 par SENP1 inhibe donc son activité désacétylase et par là même promeut l'acétylation et l'activation de p53. P53 est également SUMOylée, ce qui contribue aussi à son activation. Cependant, aucun lien direct n'a été établi entre ces deux modifications au sein de p53 à l'heure actuelle (Stehmeier and Muller, 2009).

P300 et son orthologue CBP sont des intégrateurs transcriptionnels de différents facteurs de transcription. Ils fonctionnent en tant que coactivateurs ou corépresseurs et peuvent acétyler leurs partenaires. P300 contient un domaine CRD1 (Cell cycle Regulatory Domain 1) de répression transcriptionnelle. La SUMOylation de ce domaine est nécessaire à la répression mise en place par la désacétylase SIRT1, et donc à l'inhibition de la transactivation de p300 (Bouras et al., 2005). De plus, le domaine CRD1 SUMOylé interagit avec HDAC6 (Girdwood et al., 2003).

Le cas de HIC1 sera détaillé plus loin (Stankovic-Valentin et al., 2007).

F. SUMOylation – Acétylation – Phosphorylation

Jusqu'à présent, un seul exemple a été décrit concernant la triple relation SUMOylation – Acétylation – Phosphorylation au sein de la même protéine. Il s'agit en fait d'un motif PDSM au sein duquel la phosphorylation contrôle une permutation SUMOylation/Acétylation sur la même Lysine.

Les activateurs transcriptionnels de la famille MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), qui comprend quatre membres (A à D), ont été identifiés par leur implication dans la différenciation musculaire. Ils ont également des rôles importants au sein des cellules non musculaires tels que la régulation de la réponse aux facteurs de croissance, l'expression de gènes viraux, la survie neuronale, l'apoptose des cellules T et la tumorigenèse.

La même Lysine de MEF2 peut être modifiée par Acétylation ou SUMOylation.

La découverte de la fonction E3 ligase des histones désacétylases de classe II HDAC4 et 5 a permis à cette équipe de montrer que la SUMOylation de MEF2D est stimulée par HDAC4. La désacétylation de cette même Lysine n'étant sensible qu'aux inhibiteurs des HDACs de classe III, ils ont pu mettre en évidence une interaction entre HDAC4 et SIRT1 et l'implication de cette dernière dans la désacétylation de MEF2D (Zhao et al., 2005).

D'autre part, MEF2D est phosphorylable sur une Sérine juste en aval de la Lysine SUMOylable. Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) régule positivement l'addition de SUMO sur sa Lysine cible à travers la Sérine. HDAC4 qui promeut la phosphorylation de MEF2D interagit avec Cdk5 (Gregoire et al., 2006).

Une très belle étude publiée à la même période met en relation ces trois modifications au sein de MEF2A. Cette protéine joue un rôle dans la morphogenèse des épines dendritiques du cortex cérébral. Ces auteurs montrent que la calcineurine entraîne non seulement l'activité induite par déphosphorylation de la Sérine 408 de MEF2A, mais inhibe également la SUMOylation de la Lysine 403 et promeut son acétylation. La déphosphorylation de cette protéine inhibe sa SUMOylation, ce qui mène à la dérégulation de la transcription. Alors que MEF2A acétylée se trouve dans les neurones dépolarisés, MEF2A SUMOylée augmente le nombre et la différenciation des épines dendritiques (Shalizi et al., 2006).

La transcription du gène *Nur77* étant augmentée au sein des neurones dépolarisés, ils montrent qu'il est une cible de MEF2A qui est réprimée par SUMOylation, ce qui contribue à la différenciation des épines dendritiques (Shalizi et al., 2006).

La permutation SUMOylation/acétylation dépendante de la phosphorylation est donc un signal régulant la transcription et des processus biologiques tels que le développement des synapses.

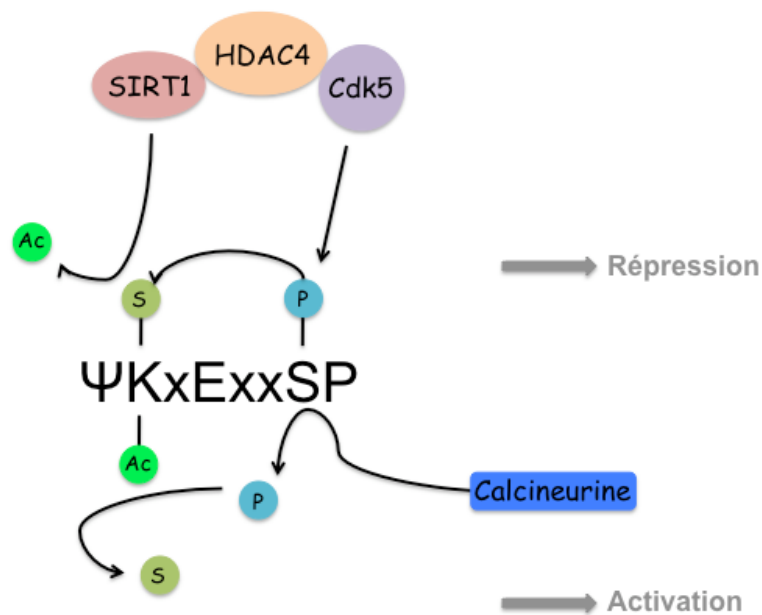


Figure 31 : Interrelations SUMOylation – Acétylation – Phosphorylation, l'exemple de MEF2.

V. HIC1 : une cible et un acteur de modifications post-traductionnelles ?

A. HIC1 et le cancer

1) Découverte de *HIC1*

Le marqueur microsatellitaire D17S5 est situé dans une région distale par rapport à celle où se trouve le gène suppresseur de tumeurs *p53*. Ce marqueur est hyperméthylé dans plusieurs types de cancers humains, et cela même en absence de lésions de la région 17p13.1, hébergeant *p53*. L'hypothèse de l'existence d'un gène suppresseur de tumeurs non identifié au sein de cette région a donc permis de caractériser la région 17p13.3, qui est riche en îlots CpG et contient le gène *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) (Wales et al., 1995).

L'hyperméthylation de la région 17p13.3 est, par exemple, un évènement fréquent au sein de tumeurs ovariennes. Elle n'est cependant pas observée dans les tumeurs de haut grade

car le chromosome hyperméthylé est sélectivement perdu, suggérant que la méthylation précède la perte d'hétérozygotie (Pieretti et al., 1995).

HIC1 est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus normaux, et son expression est absente ou fortement diminuée dans de nombreux cancers (colon, poumon, fibroblastes, sein, cerveau) au sein desquels les îlots CpG de ce gène sont hyperméthylés (Wales et al., 1995).

Ce gène a un statut particulier au sein d'au moins deux tissus ; en effet, *HIC1* est hémiméthylé dans le sein et la prostate normaux. L'expression de *HIC1* dans l'épithélium de sein normal résulte donc de l'activité transcriptionnelle d'un seul de ses deux allèles. Dans ces deux tissus, une seule étape serait donc nécessaire à l'inactivation de *HIC1* : la perte préférentielle de l'allèle non méthylé transcriptionnellement actif (LOH pour Loss Of Heterozygosity) ou la méthylation *de novo* de cet allèle (Fujii et al., 1998).

A compter de sa découverte et aujourd'hui encore, le gène *HIC1* est décrit comme étant impliqué dans de multiples types de cancers humains. Quelques exemples sont décrits ci-après.

2) Implication dans les tumeurs solides

L'étude de patients atteints de cancers gastriques a mené à l'observation de la perte d'hétérozygotie du marqueur microsatellitaire D17S5, situé au voisinage du gène *HIC1*, dans 34% des cas étudiés. 47% de ces cas de LOH présentent également une hyperméthylation de la région cible tandis que 21% de ces cas de LOH ne sont pas associés à une hyperméthylation de ce marqueur microsatellitaire. L'hyperméthylation de l'ADN à ce locus est associée à certaines étapes de la carcinogenèse gastrique et est souvent accompagnée d'une perte allélique (Kanai et al., 1998).

D'autre part, *HIC1* est plus fréquemment méthylé dans les tissus de carcinomes ovariens que dans ceux provenant d'ovaires normaux ou atteints de maladies bénignes. Cette méthylation est plus fréquente chez les femmes présentant des stades précoces de la maladie que chez celles présentant des stades tardifs (Feng et al., 2008).

Selon les études, une perte allélique de la région 17p13 est retrouvée dans 40 à 70% des cancers du sein. 64% des carcinomes mammaires possèdent une méthylation aberrante du promoteur de *HIC1*. L'altération d'une copie du gène pourrait être un événement précoce

dans la carcinogenèse mammaire ; elle précède d'ailleurs la délétion de *p53* dans le cancer de l'ovaire (Nicoll et al., 2001) (Parrella et al., 2005).

Au sein d'une lignée cancéreuse mammaire, l'expression de *HIC1* peut être restaurée en utilisant la 5-AzaCytidine, une drogue déméthylante. Il existe également une association entre l'expression de *HIC1* et l'absence de nodules métastatiques ; cette étude montre que l'expression de *HIC1* est associée à un facteur de bon pronostic. Dans une sous-classe de tumeurs mammaires est observée une inactivation biallélique de *HIC1* par hyperméthylation du promoteur et délétion chromosomique (Nicoll et al., 2001) (Parrella et al., 2005).

HIC1 est également beaucoup décrit comme impliqué dans des cancers du cerveau, surtout chez l'enfant.

Dans les médulloblastomes, le cancer cérébral le plus fréquent chez les enfants, l'altération la plus fréquente est une perte d'hétérozygotie de la région 17p13.3. Elle est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic. Ce sont les tumeurs présentant le taux de méthylation de *HIC1* le plus élevé qui ont le phénotype le plus agressif. La méthylation partielle des îlots CpG contenant *HIC1* est commune au sein des tissus normaux du cervelet ; elle est par contre aberrante dans les médulloblastomes (39%). Cette méthylation aberrante de 17p13.3, lorsqu'elle est associée à une LOH, est un évènement critique dans l'inactivation des deux allèles de *HIC1*, contribuant à l'oncogenèse (Rood et al., 2002) (Lindsey et al., 2004).

Les ependymomes représentent, en terme d'incidence, le troisième type tumoral du système nerveux central chez l'enfant. 82% des biopsies étudiées présentent une hyperméthylation de *HIC1* (Waha et al., 2004).

3) Implication dans les hémopathies malignes

L'hyperméthylation de *HIC1* est un évènement tardif dans les néoplasmes hématopoïétiques. Une méthylation significative d'un large îlot CpG dans la région centrale du gène est observée dans 83% des leucémies myéloïdes aiguës (AML pour Acute Myeloid Leukemia). Alors qu'à cette époque cette région était décrite comme étant un intron (Wales et al., 1995), on sait maintenant qu'elle fait en fait partie de la région codante du gène (Guerardel et al., 2001) (Pinte et al., 2004a). A l'inverse, l'hyperméthylation de la région 5' du gène est présente dans beaucoup de sous-types de leucémies, et seulement dans 10% des AML (Melki et al., 1999).

HIC1 a été également décrit très récemment comme étant impliqué dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL pour Diffuse Large B Cell Lymphoma). En effet, des délétions 17p sont détectées dans 20% des DLBCL analysés. Dans 42% des cas, la région entière 17p13.3 est perdue, et une inactivation de *p53* par délétion et/ou mutation est observée dans 65% des cas. Par contre, 90% des DLBCL montrent une hyperméthylation de *HIC1* ; une délétion simultanée peut être présente menant à une inactivation biallélique (Stocklein et al., 2008).

Il existe une réduction significative de la survie des patients atteints de DLBCL qui ont une inactivation complète de *p53* et *HIC1*. Cependant, l'inactivation de *HIC1* diminue également le temps de survie chez les patients présentant le gène *p53* normal (Stocklein et al., 2008).

Le syndrome de Sézary est un type agressif de lymphome/leucémie cutané des cellules T, impliquant les cellules T mémoires CD4⁺. Il est caractérisé par la présence de cellules T néoplasiques, les cellules de Sézary, dans la peau, les nodules lymphatiques et le sang. Chez 55% des patients étudiés, une perte de la région 17p13.3-13.1 a été observée (Vermeer et al., 2008).

4) *HIC1* : un gène suppresseur de tumeurs

La perte d'expression de *HIC1* dans tous ces types cancéreux mène naturellement à penser qu'il soit l'un des gènes suppresseurs de tumeurs situé en 17p différent de *p53*. D'ailleurs, l'expression constitutive de *HIC1* dans des cellules tumorales en culture peut ralentir la croissance, réduire la survie, ou conduire à la différenciation (Wales et al., 1995).

La preuve formelle de son statut de suppresseur de tumeurs a été amenée par l'étude de souris hétérozygotes pour ce gène.

Les souris *Hic1*^{+/-} se développent normalement au cours de leur première année de vie, puis elles développent des tumeurs spontanées avec une incidence plus élevée que les souris contrôles. La prédisposition à la malignité est dépendante de l'âge (après 70 semaines) (Chen et al., 2003).

Une observation intéressante mais non expliquée à ce jour est la différence de type tumoral développé selon le sexe de l'animal. Dans des modèles murins, ce sont généralement des sarcomes et des lymphomes qui sont développés. Dans ce cas, tandis que les mâles développent 75% de cancers épithéliaux, les femelles présentent 85% de cancers lymphoïdes et mésenchymateux (Chen et al., 2003).

Hic1 a ainsi été le premier gène hyperméthylé défini comme suppresseur de tumeurs en absence de mutation (Chen et al., 2003).

5) Relations *HIC1/p53*

La découverte du gène *HIC1*, voisin de *p53*, et inactivé soit seul soit en même temps que *p53*, a incité l'équipe de S. Baylin à obtenir des souris doubles hétérozygotes *Hic1^{+/-} p53^{+/-}*, sur le même chromosome (en cis) ou sur les chromosomes homologues (en trans) (Chen et al., 2004).

Les souris doubles hétérozygotes *Hic1^{+/-} p53^{+/-}* en trans ne présentent pas de tumeurs malignes différentes en fonction du sexe ni d'accélération de la tumorigenèse par rapport aux simples hétézygotes. Par contre, elles développent de manière dépendante de l'âge des ostéosarcomes avec une incidence beaucoup plus importante que pour les *p53^{+/-}*. L'incidence des sarcomes et des lymphomes ne change pas. Ces souris développent également des types tumoraux non observés chez les souris simples hétérozygotes *Hic1^{+/-}* ou *p53^{+/-}* : des tumeurs mammaires, ovariennes, neuroendocrines métastatiques et du cerveau (Chen et al., 2004).

Les souris doubles hétérozygotes *Hic1^{+/-} p53^{+/-}* en cis présentent, quant à elles, une tumorigenèse accélérée par rapport aux *p53^{+/-}*. Elle développent également de manière prédominante des ostéosarcomes avec une incidence beaucoup plus élevée que pour les *p53^{+/-}*. L'incidence des ostéosarcomes métastatiques est beaucoup plus élevée chez les souris cis et trans par rapport aux *p53^{+/-}* (Chen et al., 2004).

Chez les souris trans *Hic1^{+/-} p53^{+/-}* la perte d'expression de *Hic1* passe par l'hyperméthylation de l'allèle *Hic1* restant. L'inactivation épigénétique de *Hic1* coopère donc avec la perte de fonction de *p53* pour faciliter l'évolution des tumeurs (Chen et al., 2004).

Par contre, chez les souris cis *Hic1^{+/-} p53^{+/-}* est observée une élimination complète du chromosome restant, ce qui explique la tumorigenèse accélérée par rapport aux souris hétérozygotes en trans, cette élimination étant encore plus facile (Chen et al., 2004).

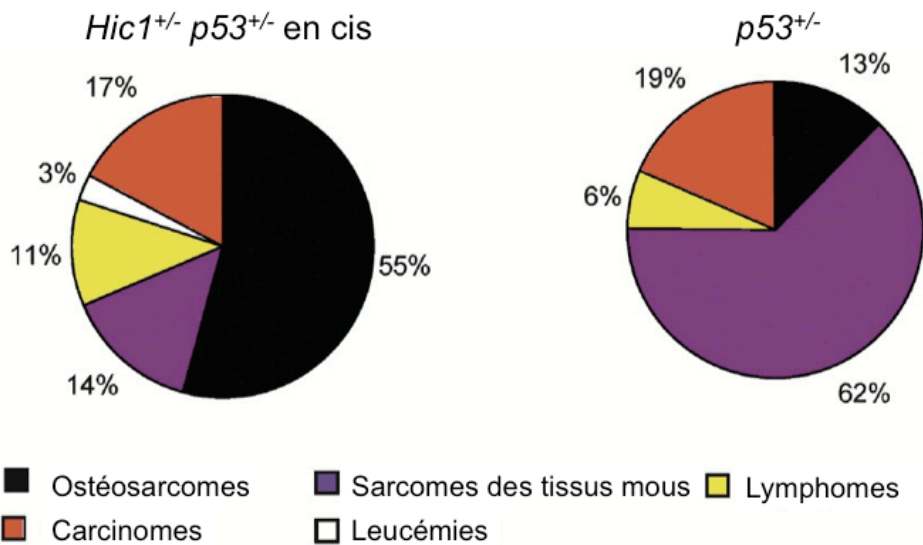


Figure 32 : Phénotype des souris doubles hétérozygotes *Hic1*^{+/-} *p53*^{+/-} en cis et des souris simple hétérozygotes *p53*^{+/-} (Chen et al., 2004).

Dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblast) inactivés pour *p53*, le LPS (Lipopolysaccharide), seul ou en association avec INF γ (Interferon γ), induit une méthylation des sites CpG du gène *Hic1*. Ce traitement augmente l'expression des méthylases de maintenance et *de novo* de l'ADN, Dnmt1, 3a et 3b. L'expression de Dnmt1 est d'ailleurs plus importante dans les MEF *p53*^{-/-} que dans les *p53*^{+/+} (Tatemichi et al., 2008).

6) *HIC1* : un gène pré marqué des cellules souches cancéreuses ?

Récemment, le statut épigénétique d'un groupe de gènes fréquemment hyperméthylés et éteints dans les cancers adultes a été comparé entre les cellules souches embryonnaires normales ES (Embryonic Stem cells) et leur contrepartie maligne EC (Embryonic Carcinoma cells). Les gènes présentant leurs îlots CpG hyperméthylés dans les cancers adultes humains sont généralement non méthylés au sein de ces deux types cellulaires. *HIC1* fait partie de ces gènes (Ohm et al., 2007).

Les cellules ES et EC en souris immunodéficientes NOD/SCID forment respectivement des tératomes (tumeurs formées par les cellules germinales pluripotentes) et des tératocarcinomes. Il est observé un changement d'expression de gènes dans ces tumeurs :

beaucoup de gènes présentent un statut bivalent au niveau de leur promoteur (avec une marque activatrice H3K4Me2 et une marque répressive H3K27Me3) dans les cellules ES. Parmi eux, on retrouve les gènes fréquemment éteints de manière épigénétique dans les cancers. Ces gènes acquièrent deux marques répressives additionnelles dans les cellules EC : H3K9Me3 et Me2. Dans les cancers adultes, ces gènes présentent une diminution de la marque H3K4Me et sont enrichis en H3K9Me2. Le schéma épigénétique répressif des cellules EC pourrait donc représenter un statut transitoire, facilitant la progression néoplasique (Ohm et al., 2007).

Le dialogue menant à la méthylation de l'ADN aurait probablement lieu précocément lors de l'oncogenèse, quand la distribution du complexe PRC2 (Polycomb-Repressive Complex 2) ressemble à celle des cellules souches. Il pourrait donc exister une origine de cellules souches des cancers dans lesquelles la répression des gènes serait remplacée par une extinction permanente, bloquant la cellule dans un statut d'auto-renouvellement perpétuel et donc la prédisposant à la transformation maligne (Widschwendter et al., 2007).

B. HIC1 et le syndrome de Miller-Dieker

Le syndrome de Miller-Dieker (MDS) est une maladie développementale rare (3,5 cas par million de naissances) due à une délétion monogénique continue de la région 17p13.3 d'environ 350 kb. Les enfants atteints par ce syndrome meurent pendant les premières années de la vie. Ils présentent un retard de développement sévère avec de graves anomalies faciales : un fort tour de tête, un creux bitemporal, les oreilles écrasées, un petit nez retroussé avec une dépression à la racine, une lèvre inférieure fine et un petit menton. Ces enfants présentent également des anomalies cardiaques et congénitales et une lissencéphalie cérébrale caractérisée par un cortex épais, un élargissement postérieur des ventricules latéraux et une hyperplasie du corps calleux (Pilz, 2003) (Cardoso et al., 2003).

Cette délétion entraîne l'haploinsuffisance d'au moins neuf gènes dont *ILS* (Isolated Lissencephaly), responsable du phénotype de lissencéphalie de type I, *MNT/ROX*, *OVCA1*, *OVCA2* et *HIC1*. De manière évidente, plus la délétion est grande, plus le syndrome est sévère. Le marqueur microsatellitaire D17S5 a été utilisé comme marqueur pour diagnostiquer les MDS (Grimm et al., 1999) (Pilz, 2003) (Cardoso et al., 2003).

Certains territoires d'expression de HIC1 coïncident avec des régions présentant des anomalies dans le MDS. En effet, chez la souris, Hic1 est exprimé dans les territoires dérivés des somites (le mésoderme), les membres, les mésenchymes cranio-faciaux et ceux qui font

face à l'épithélium des organes internes (Grimm et al., 1999). Chez le Poisson Zèbre, ZfHIC1 est exprimé dans les mésenchymes de la tête, autour du nez et des yeux, ainsi que dans les arcs branchiaux (Bertrand et al., 2004).

Chez la souris, l'inactivation du gène *Hic1* par recombinaison homologe entraîne une mort embryonnaire tardive voire périnatale, avec des embryons *Hic1*^{-/-} morts nés. Les embryons *Hic1*^{-/-} ont une taille plus petite, impliquant un retard global de développement, des défauts du développement cranio-facial, une dysmorphie des membres et des doigts ainsi que des défauts de la face ventrale du corps (hernie ombilicale et boucles de l'intestin). Le phénotype des souris *Hic1*^{-/-} est proche de celui des souris *Ovca1*^{-/-}, gène situé au voisinage immédiat de *Hic1*. Ces phénotypes de défauts développementaux évoquent ceux observés chez les patients atteints par le syndrome de Miller-Dieker (Carter et al., 2000).

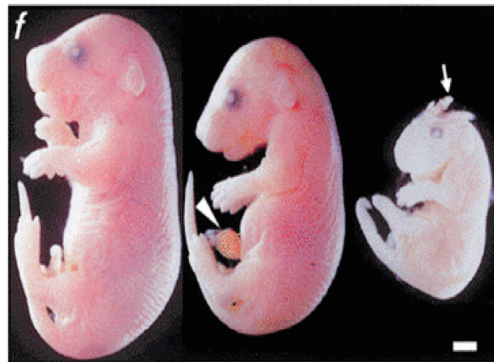


Figure 33 : Embryons de souris *Hic1*^{+/+} sur la gauche, et deux *Hic1*^{-/-} sur la droite (Carter et al., 2000).

On peut noter malgré tout que la comparaison est effectuée entre une délétion hémizygote chez l'Homme et une inactivation totale chez la souris. Cependant, c'est souvent le cas lors de comparaison entre une maladie humaine et son « homologue » murine. De plus, il n'a jamais été étudié si, au sein des MDS, l'allèle restant de *HIC1* est exprimé, ou s'il est méthylé comme dans les tumeurs de souris *Hic1*^{+/-}. Ceci n'est donc pas incompatible avec la conclusion portée sur l'implication de *HIC1* dans cette maladie développementale.

C. HIC1 est un répresseur transcriptionnel

1) La protéine HIC1

La protéine HIC1 est codée par un exon unique. La régulation transcriptionnelle de ce gène est complexe car due à la présence de trois promoteurs différents, auxquels s'ajoutent des mécanismes d'épissage alternatif. Le transcrit majeur code une protéine de 714 acides aminés (Guerardel et al., 2001) (Pinte et al., 2004a) (Mondal et al., 2006).

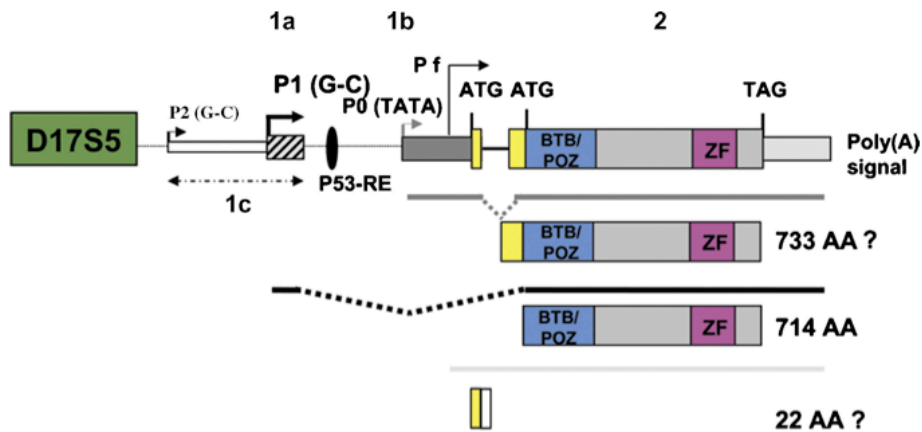


Figure 34 : Organisation génomique du locus *HIC1* humain (Fleuriet et al., 2009).

Cette protéine est un facteur de transcription possédant plusieurs domaines fonctionnels distincts. En N-terminal est présent un domaine BTB/POZ (Broad Complex, Tramtrack, Bric à brac/POX viruses and Zinc fingers) d'homodimérisation et de multimérisation. Ce domaine est suivi par une région centrale peu conservée à l'exception de quelques séquences notables, puis viennent des doigts de zinc C_2H_2 de type Krüppel dans la partie C-terminale (Wales et al., 1995) (Deltour et al., 1999).

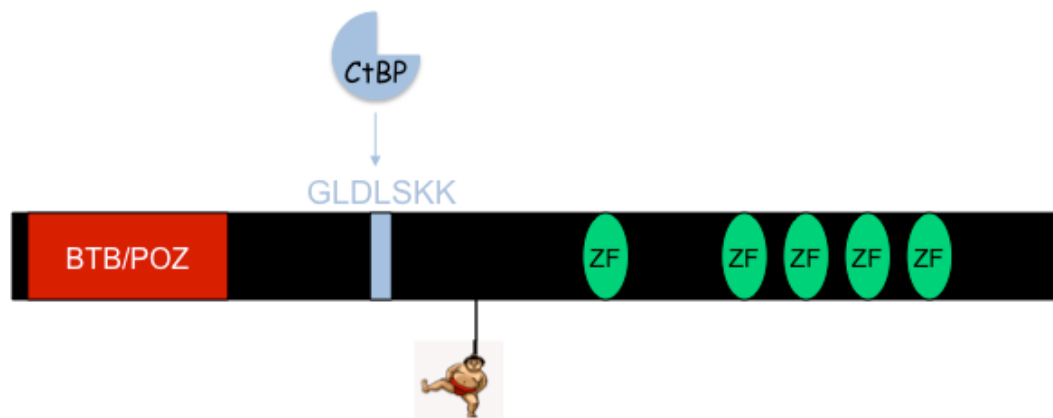


Figure 35 : Schéma représentatif de la protéine HIC1.

Le domaine BTB/POZ de HIC1 possède une activité répressive autonome insensible aux inhibiteurs de désacétylases de classes I, II et III, la TSA (Trichostatine A) et la NIA (Nicotinamide) (Deltour et al., 1999) (résultats non publiés).

HIC1 possède un paralogue en 22q11.2, *HRG22* (*HIC1 related gene on chromosome 22*), qui code une protéine de 555 acides aminés. L'alignement de séquence entre les protéines HIC1 et HRG22 révèle, en plus du domaine BTB/POZ et des doigts de zinc, deux régions de forte conservation au sein de la région centrale. Contrairement au domaine BTB/POZ, cette région centrale possède une activité de répression transcriptionnelle autonome qui recrute des HDACs (Deltour et al., 2001) (Deltour et al., 2002).

Le premier motif parfaitement conservé est fortement homologue au site PxDSL de recrutement de CtBP : GLDLSK^{K/R}, au sein duquel la Leucine invariante essentielle pour le recrutement se trouve en position 225. HIC1 interagit avec CtBP via ce motif, ce qui nécessite la dimérisation par le domaine BTB/POZ (Deltour et al., 2002).

Les protéines CtBP sont connues pour être régulées par le NADH qui favorise leur dimérisation. Le chlorure de cobalt (CoCl₂) ou l'hypoxie, qui augmente le taux de NADH libre au sein de la cellule, favorise l'interaction HIC1-CtBP1. Cette interaction est abolie par la mutation L225A.

CtBP est responsable, au moins en partie, de la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1, puisque la mutation L225A diminue le potentiel de répression. Cependant, elle ne l'abolit pas. La région centrale de HIC1 met en place des mécanismes de répression transcriptionnelle dépendants et indépendants de CtBP ; les deux nécessitent le recrutement d'une activité HDAC de classe I ou II (Deltour et al., 2002) (Stankovic-Valentin et al., 2006).

Le second peptide phylogénétiquement conservé au sein de cette région centrale est YRW^{M/V}KxEP, qui contient un site consensus de SUMOylation Ψ KxEP, où la Lysine modifiable se trouve en position 314. Les mutants K314R et E316A ne sont plus SUMOylables (Stankovic-Valentin et al., 2007).

Les E3 ligases PIAS1 et X α permettent la modification de HIC1 par SUMO1, qui est réversible sous l'action de la déSUMOylase SENP2/SSP3.

La SUMOylation n'affecte pas la localisation subcellulaire de HIC1. Par contre, elle régule positivement son potentiel de répression transcriptionnelle (Stankovic-Valentin et al., 2007).

Ce site de SUMOylation englobe également un motif d'acétylation de type KxxP, où la Lysine modifiable est toujours la K314. HIC1 est acétylé par CBP/p300, sur plusieurs Lysines dont la

K314. De plus, la mutation P317A affecte l'acétylation mais pas la SUMOylation. Le site Ψ KxEP est donc un motif de permutation acétylation/SUMOylation (Stankovic-Valentin et al., 2007).

HIC1 interagit avec HDAC4 et SIRT1, indépendamment de la SUMOylation. Par contre, la SUMOylation de HIC1 est augmentée quand SIRT1 est surexprimée, et diminuée en présence d'un ARN interférant ciblant SIRT1. HDAC4 n'a, quant à elle, pas d'effet sur l'acétylation de HIC1. SIRT1 permettrait donc la désacétylation de HIC1 et HDAC4 serait impliquée dans sa SUMOylation via son activité de « E3 facilitase » ; en effet, HDAC4 ne serait pas une réelle SUMO E3 ligase mais faciliterait la liaison de la molécule de SUMO à la protéine cible. La TSA diminue également la SUMOylation indiquant que des HDACs de classe I ou II régulent également la désacétylation de la Lysine 314, et donc la SUMOylation de HIC1 (Stankovic-Valentin et al., 2007).

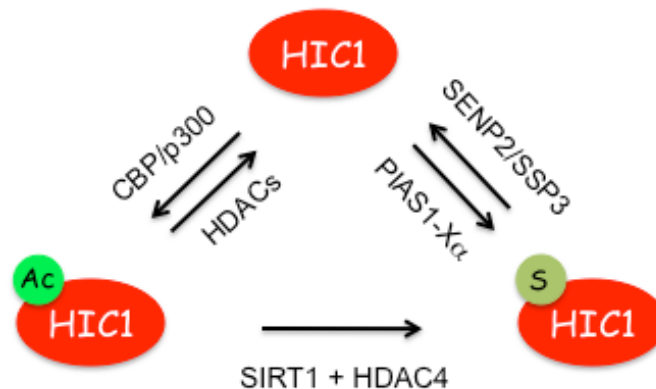


Figure 36 : Permutation acétylation / SUMOylation de HIC1.

Ces modifications post-traductionnelles ne sont pas les seules à cibler HIC1. En effet, cette protéine est par exemple modifiée par la O-GlcNAc (O-Linked N-Acetylglucosamine) au sein de sa partie C-terminale et sur ses doigts de zinc. Le rôle de cette modification n'est pas encore élucidé ; elle n'affecte pas la propriété de liaison aux éléments de réponse à l'ADN de la protéine (Lefebvre et al., 2004).

De plus, HIC1 est également modifiée par phosphorylation, mais les sites cibles ne sont pas identifiés (Lefebvre, résultats non publiés).

2) Répression directe

- Liaison à l'ADN

La séquence consensus de liaison de HIC1 à l'ADN *in vitro* a été définie au cours de la Thèse de Sébastien Pinte (Pinte et al., 2004b). Elle peut être restreinte à 12 pb, 5'- $\text{C}_G\text{NG}^{\text{C}}/\text{G}\text{GGGCA}^{\text{C}}/\text{A}\text{CC}-3'$, et a été baptisée HiRE pour HIC1 Response Element. Cette séquence optimale est centrée autour du cœur GGCA, et ces nucléotides sont essentiellement liés par les ZF3 et 4. La protéine HIC1 de pleine longueur ne lie pas un site unique, mais peut lier de manière coopérative et dépendante du BTB/POZ une cible constituée de plusieurs copies de la séquence de liaison, 5 HiRE. Ceci laisse supposer un modèle de repliement de l'ADN via l'association de plusieurs protéines HIC1 entre elles ainsi qu'à différentes séquences cibles, comme illustré sur la figure suivante (Pinte et al., 2004b).

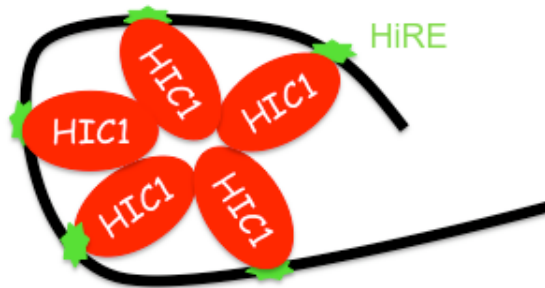


Figure 37 : Modèle de repliement de l'ADN par liaison de plusieurs molécules de HIC1 sur ses éléments de réponse HiRE.

Le premier gène cible direct de HIC1 a été identifié par l'équipe de S Baylin. Il s'agit du gène codant la désacétylase de classe III, SIRT1. Cette première cible implique HIC1 au sein d'une boucle de régulation qui sera décrite plus loin (Chen et al., 2005).

Trois autres gènes cibles directs ont été décrits jusqu'alors.

- *FGF-BP1*

Au cours de l'angiogenèse, deux familles de facteurs de croissance sont importantes.

Le TGF β (Transforming Growth Factor β) et sa signalisation sont critiques pour la formation des muscles lisses vasculaires pendant le développement. Ce facteur de croissance inhibe la

prolifération et la migration de cellules endothéliales ainsi que la formation de structures en tubes en gel de collagène. Le traitement des cellules de la crête neurale avec le TGF β résulte en l'adoption d'un phénotype de muscle lisse (Abuharbeid et al., 2006).

Une autre famille importante, ayant un rôle opposé à la précédente pendant l'angiogenèse, est celle des FGFs (Fibroblasts Growth Factor). Ces facteurs de croissance induisent la prolifération endothéliale, la migration et la formation de tubes. Ils inhibent la différenciation du muscle lisse. Pour mener à bien leur action, les FGFs requièrent des protéines extracellulaires de la famille FGF-BP1 (Fibroblast Growth Factor-Binding Protein 1), qui ont un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale et le développement de vaisseaux sanguins chez l'embryon. FGF-BP1 est une protéine sécrétée qui lie les FGFs. Ces derniers sont typiquement stockés sur les protéoglycanes héparanes sulfatés de la matrice extracellulaire ; ils restent inactifs et FGF-BP1 agit comme une protéine chaperonne qui les lie et les présente aux récepteurs tyrosine kinase. Il existe un rôle de FGF-BP1 dans la régulation des FGFs spécifiquement pendant la croissance des vaisseaux sanguins dans les tumeurs et dans le développement de l'embryon (Abuharbeid et al., 2006).

Une étude effectuée dans des cellules se différenciant en muscle lisse après traitement au TGF β montre que l'expression de FGF-BP1 diminue après ce traitement. Cet effet passe par les protéines Smad2 et 3, les protéines de transduction du signal typiques du TGF β . En effet, la diminution de leur expression empêche la répression de l'activité du promoteur de *FGF-BP1*, et, à l'inverse, l'augmentation de leur expression potentialise cet effet répresseur.

Au sein du promoteur de *FGF-BP1* se trouvent des éléments de réponse à HIC1. Un site GGCA se situe entre les bases -799 et -761, région responsable de la répression mise en place par le TGF β . La protéine HIC1 lie ce site *in vitro*, et la mutation des bases GGCA en TTAG inhibe la répression du promoteur. *FGF-BP1* est donc un gène cible direct de HIC1 (Briones et al., 2006).

- *ATOH1*

Comme nous l'avons vu précédemment, HIC1 est fortement impliquée dans les médulloblastomes, essentiellement chez l'enfant.

Les médulloblastomes surviennent dans une population progénitrice neuronale du développement du cervelet, les précurseurs des cellules granulaires (GCPs pour Granular Cells Precursors). Pendant le développement, ces cellules présentent une expansion rapide

au sein de la couche cellulaire granulaire externe (EGL). Au cours de la différenciation terminale, elles descendent à travers la couche moléculaire, où se trouvent les cellules de Purkinje, pour former les cellules granulaires matures qui résident dans la couche granulaire interne (IGL) (Briggs et al., 2008a) (Briggs et al., 2008b).

Puisque la différenciation des cellules granulaires peut être liée à la migration des couches EGL à IGL, le cervelet représente un modèle idéal de différenciation neuronale.

L'expansion du compartiment GCP est dépendante de la signalisation Hedgehog (Hh), mise en place par la protéine Sonic Hedgehog (Shh). *PATCHED (PTCH)* code le récepteur de la signalisation Hh. C'est un gène suppresseur de tumeurs dans les médulloblastomes (Briggs et al., 2008a) (Briggs et al., 2008b).

La perte d'hétérozygotie de la région 17p13.3 est le défaut génétique le plus fréquent dans les médulloblastomes sporadiques. *PTCH* étant un suppresseur de tumeurs dans les médulloblastomes, une étude a porté sur l'implication que pouvaient avoir les gènes *Ptch* et *Hic1*, chez la souris, dans ce type de cancer.

Les souris double hétérozygotes *Ptch1^{+/-} Hic1^{+/-}* présentent une augmentation de l'incidence des médulloblastomes de 4 fois par rapport aux simples hétérozygotes *Ptch1^{+/-}*; ce sont les mêmes tumeurs avec le même temps de croissance (Briggs et al., 2008a) (Briggs et al., 2008b).

Pendant le développement du cerveau chez la souris, *Hic1* est absente de la couche externe (EGL) mais est détectable dans les cellules bordant la partie interne de l'EGL. Sa présence est importante dans les cellules des couches moléculaires et IGL, ainsi que dans les cellules de Purkinje.

L'homologue humain de *Atonal*, *ATOH1*, qui code un facteur de transcription, est le marqueur connu le plus précoce de la couche EGL et est requis pour le développement de cette population progénitrice. Il est fortement exprimé dans les GCPs et son expression est éteinte suivant la différenciation et la descente dans la couche IGL. *ATOH1* est une cible de la signalisation Hh dans le développement du cervelet et des médulloblastomes.

Hic1 ne joue pas de rôle majeur dans la signalisation Hh. Par contre, l'expression de *ATOH1* est significativement réduite par l'expression exogène de *HIC1*.

Dans le cervelet de souris à 14 jours, *Hic1* est lié à l'enhancer de *Atoh1*. L'effet de l'absence de *HIC1* au sein des médulloblastomes doit certainement passer par l'expression augmentée de *ATOH1*, puisque la diminution d'expression de *Atoh1* dans les lignées dérivées des tumeurs *Ptch1^{+/-} Hic1^{+/-}* diminue dramatiquement la viabilité cellulaire.

Ces résultats ont donc mené cette équipe à étudier l'effet de HIC1 au cours de la différenciation des GCPs. Pour ce faire, ils ont isolé ces cellules en prolifération avec une activité de signalisation Hh maximale, puis les ont mises 9 jours en culture. L'expression de *Hic1* augmente à partir de J0 avec un maximum à J6, ce qui coïncide avec la perte d'expression de *Atoh1*.

Les seules cellules capables de proliférer *in vitro* en réponse à Shh sont des GCPs immatures positives pour *Atoh1*. Shh prévient donc la différenciation spontanée et maintient l'expression de *Atoh1*. Par contre, la suppression de l'expression de *Atoh1* par *Hic1* est dominante à l'expression de *Atoh1* mise en place par Shh. *Hic1* peut donc agir en aval de Shh pour réprimer l'expression de *Atoh1*. Son expression pourrait servir à rendre les GCPs insensibles au Shh et permettre la différenciation terminale de ces cellules, malgré l'exposition à des hauts taux de Shh au cours de leur migration (Briggs et al., 2008a) (Briggs et al., 2008b).

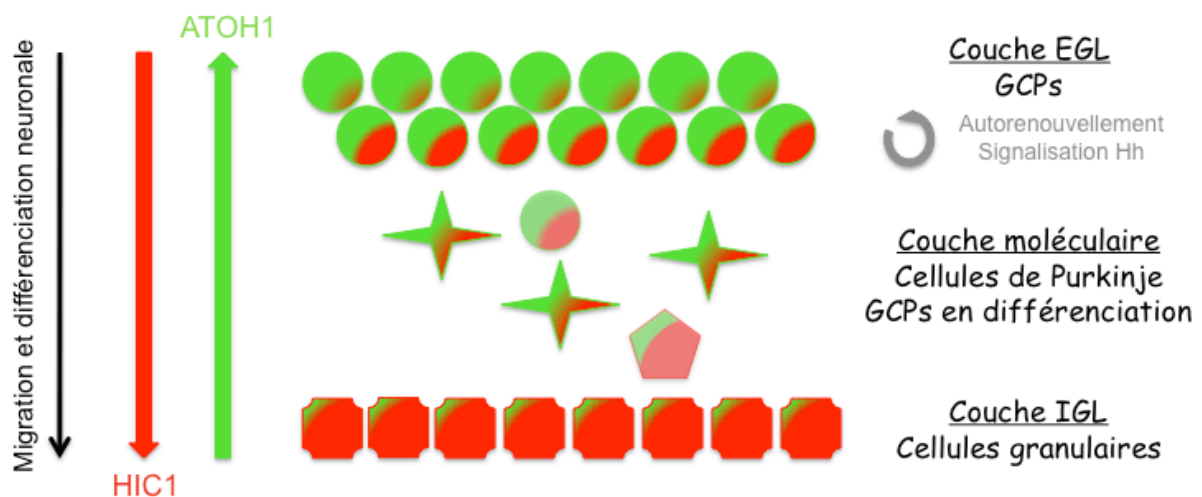


Figure 38 : Migration et différenciation neuronale au sein du cervelet.

Cette étude a permis aux auteurs de proposer un modèle concernant l'origine des médulloblastomes chez les souris double hétérozygotes *Ptch1^{+/-} Hic1^{+/-}*. Une caractéristique des souris *Ptch1^{+/-}* est l'accumulation de petits îlots de cellules EGL persistantes à la surface du cervelet. Ces cellules pourraient être les précurseurs des médulloblastomes, nécessitant un déficit génétique additionnel afin d'acquérir un phénotype transformé. Ceci pourrait fournir une explication potentielle concernant l'augmentation de l'incidence des médulloblastomes chez les souris *Ptch1^{+/-} Hic1^{+/-}*.

- *E2F1*

Ce troisième gène cible de HIC1, récemment identifié, est impliqué au sein d'une boucle de régulation détaillée plus loin (Zhang et al., 2009).

3) Répression indirecte

Jusqu'alors, une seule étude a mis en évidence un effet répresseur de la transcription de HIC1 sans liaison à l'ADN, par séquestration de facteurs dans le nucléoplasme (Valenta et al., 2006). Cette propriété avait déjà été établie pour d'autres protéines à domaine BTB/POZ, notamment BCL6.

La signalisation Wnt (Wingless-type MMTV integration site family member) joue des rôles essentiels dans différents processus développementaux, incluant la détermination cellulaire, la survie des cellules ES et l'organogenèse. L'activation de cette signalisation par mutation est impliquée dans la dérégulation de la croissance cellulaire et donc dans la cancérogenèse. En absence de signal Wnt, la β -caténine est phosphorylée par le complexe APC (Adenomaous Polyposis Coli), entraînant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Les facteurs Wnt agissent en inhibant le complexe APC. La β -caténine se retrouve donc dans le noyau où elle peut s'associer avec des facteurs de transcription de la famille TCF (Transcription Factor), qui possèdent une activité de « connecteurs », liant d'autres polypeptides à des promoteurs. La β -caténine possédant un domaine de forte activation de la transcription, son interaction avec les TCFs entraîne la transcription des gènes de réponse à Wnt. Chez les mammifères, les TCFs se lient aux corépresseurs TLE (Transducin-Like-Enhancer of split orthologs), et, en absence de signal Wnt, répriment la transcription à des promoteurs spécifiques. TCF3 et 4, quant à eux, s'associent au corépresseur CtBP (Valenta et al., 2006).

HIC1 est un antagoniste de l'activation transcriptionnelle mise en place par TCF4, mais est absente des promoteurs cibles de cette protéine. Par contre, HIC1, TCF4 et CtBP1 colocalisent dans des cellules en culture. Il s'avère que la répression de la transcription mise en place par TCF4 via HIC1 est dépendante du recrutement de TCF4 aux corps nucléaires contenant HIC1, et non de l'interaction directe de HIC1 aux promoteurs des gènes réprimés.

La séquestration de TCF4 par HIC1 affecte donc la transcription dépendante de Wnt. En plus de TCF4, HIC1 séquestre la β -caténine dans les corps nucléaires. HIC1 élimine donc complètement l'association de la β -caténine aux éléments de réponse à TCF. Ceci requiert l'interaction de HIC1 avec CtBP, puisque le mutant (HIC1 Δ CtBP) empêchant cette interaction est deux fois moins actif que la protéine normale. Le domaine BTB/POZ est également indispensable puisque sa délétion (HIC1 Δ POZ) abolit complètement l'effet répresseur. Par cette action, HIC1 bloque la stimulation par Wnt3a des gènes *Axin2*, *Sp5*, et *Cycline D1* (Valenta et al., 2006).

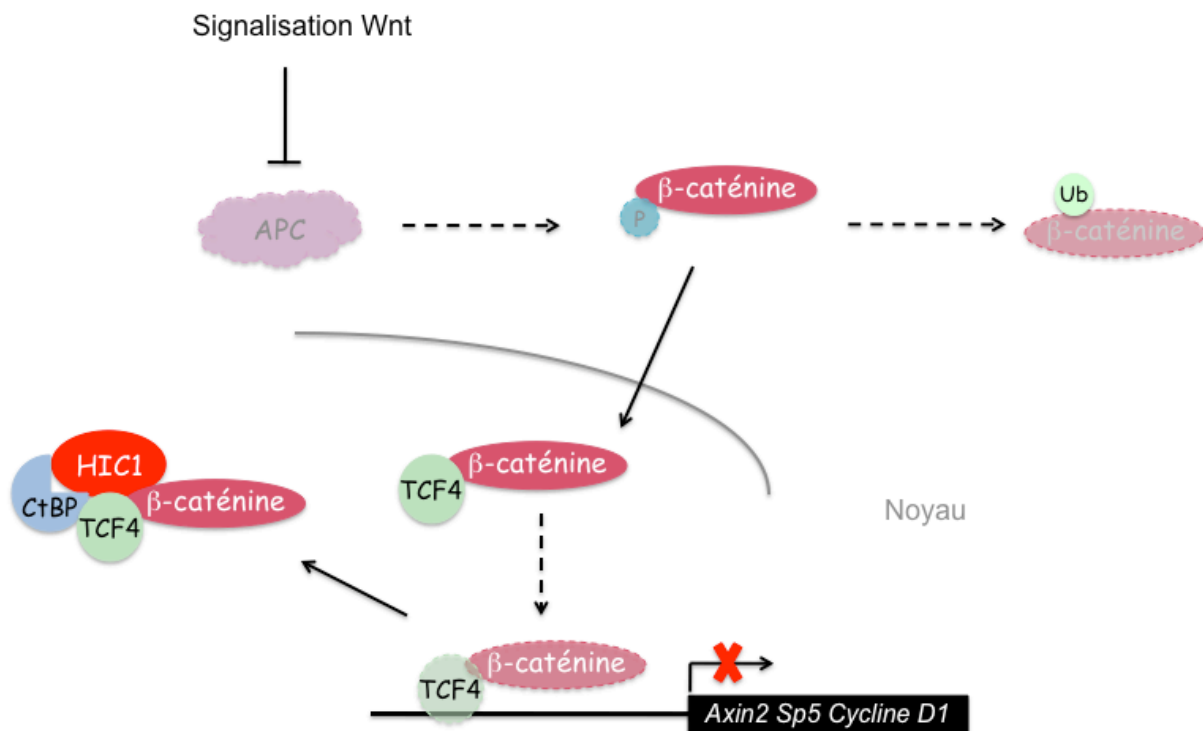


Figure 39 : Répression transcriptionnelle indirecte mise en place par HIC1, par séquestration de TCF4 et de la β -caténine dans le nucléoplasme, empêchant leur fonction d'activation transcriptionnelle.

Cette étude élargit donc l'horizon de la recherche de gènes cibles de HIC1, puisque cette protéine peut avoir un effet répresseur direct par liaison à des promoteurs cibles, mais également un effet indirect par séquestration de facteurs au sein de corps nucléaires, empêchant leur propre action sur l'ADN.

4) Focus sur le contrôle de l'activité d'un gène cible direct : *SIRT1*

- L'acétylation

SIRT1 est impliquée dans une PTM (modification post-traductionnelle) largement décrite pour modifier les histones, mais également importante pour l'activité de protéines non histones : l'acétylation.

Il est décrit un rôle important de l'acétylation et la désacétylation des protéines non histones dans la physiologie cellulaire. L'acétylation des facteurs de transcription peut résulter en l'altération de leur liaison à l'ADN, activation transcriptionnelle, stabilité protéique, localisation subcellulaire, ou en l'altération d'interactions protéine-protéine (Whittle et al., 2007).

Le premier effet de l'acétylation réversible des Lysines est la neutralisation de leur charge positive, et donc la modulation des propriétés biochimiques des protéines contenant ces résidus. Elle empêche également la capacité des Lysines à former des liaisons hydrogènes. Deux types d'enzymes sont impliqués dans cette modification : les HATs (Histones Acetyl Transferases) qui utilisent l'acétyl-CoA pour le transfert d'un groupement acétyl au substrat, et les HDACs (Histones Deacetylases) qui abolissent la modification (Sadoul et al., 2008) (Yang and Seto, 2008).

Il existe différentes classes d'HDACs. *SIRT1* fait partie des HDACs de classe III ; elle est l'homologue mammifère de la protéine Sir2 (Silent information regulator 2) de levure, le membre fondateur des sirtuines.

Les sirtuines (*SIRT1* à 7) constituent une famille de désacétylases et/ou d'ADP-ribosyltransferases, nécessitant comme cofacteur essentiel le NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide). Cette dépendance lie l'activité des sirtuines à l'état métabolique de la cellule (Kwon and Ott, 2008) (Feige and Auwerx, 2008).

Chez les mammifères, l'activité HDAC semble être restreinte à *SIRT1*, 3 et 6 (Feige and Auwerx, 2008).

SIRT1 est connue pour désacétyler plus d'une dizaine de substrats, incluant p53 et E2F1, les récepteurs nucléaires AR (Androgen Receptor) et ER α (Estrogen Receptor), leurs coactivateurs PGC1 α et p300, ainsi que plusieurs facteurs de transcription régulés par p300 (NF κ B, FKHR). La désacétylation de p300 au sein de sa région CRD1 (Cell Cycle Regulatory Domain 1), qui inhibe son activité, intègre les signaux métaboliques dans la cellule, car divers récepteurs nucléaires sont régulés par p300 (Whittle et al., 2007).

- *SIRT1* : oncogène ou gène suppresseur de tumeurs ?

SIRT1 est plutôt décrite comme une protéine codée par un oncogène. En effet, elle bloque la sénescence, la différenciation cellulaire, l'apoptose induite par le stress et promeut la croissance cellulaire, l'angiogenèse et la vasodilatation. Beaucoup de ces effets passent par la désacétylation de p53.

Elle régule la désacétylation et la méthylation des histones et désacétyle également un grand nombre de protéines non histones (des facteurs de transcription, des protéines de réparation de l'ADN, des facteurs de signalisation). Elle diminue l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription tel que p53, et augmente celle d'autres comme BCL6 (Liu et al., 2009).

SIRT1 est un facteur de longévité chez les mammifères. La restriction calorique prolonge la durée de vie chez la levure, les vers, les mouches et les souris en augmentant l'activité cellulaire de *SIRT1*. Le taux de *SIRT1* diminue quand les souris suivent un régime riche en graisses, ce qui cause la résistance à l'insuline (Kwon and Ott, 2008).

Dans les cellules cancéreuses, la présence de *SIRT1* rend les cellules résistantes à la sénescence répliquative après stress oxydatif et facilite le développement tumoral, car moins d'apoptose est induite par p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Kwon and Ott, 2008). Le stress oxydatif, ainsi que les dommages à l'ADN, causent un changement majeur de distribution de *SIRT1* le long du génome, ce qui affecte l'expression des gènes (Oberdoerffer et al., 2008).

Cependant, un rôle suppresseur de tumeurs a été décrit pour cette protéine *in vivo*. En effet, l'augmentation de l'activité de *SIRT1* ou de sa quantité peut augmenter la stabilité génomique *in vivo* et supprimer la tumorigenèse (Oberdoerffer et al., 2008).

De plus, l'augmentation d'expression de *SIRT1* dans un modèle murin de cancer du colon dépendant de la β -caténine supprime la formation de tumeurs intestinales. L'effet de *SIRT1* varie donc en fonction des modèles tumoraux, dépendant des cibles de cette enzyme (Kwon and Ott, 2008).

La promotion d'un programme de réparation de l'ADN qui chevauche le sort apoptotique suggère que le rôle physiologique de *SIRT1* dans les cellules mammifères empêche la tumorigenèse et assure la longévité cellulaire. Cependant, l'inhibition continue de l'apoptose pourrait aider au développement d'une transformation néoplasique non réparable.

L'effet précis de SIRT1 pourrait être dépendant du statut génétique de la cellule ou de la tumeur en question, par exemple en fonction de la présence ou de l'absence de p53. Dans les cellules possédant p53, SIRT1 promeut la sénescence cellulaire et limite la prolifération, particulièrement des cellules exposées à des formes de stress chroniques non létaux. Dans les cellules ayant perdu p53 ou d'autres suppresseurs tumoraux comme HIC1, la suppression de SIRT1 est perdue ; des fonctions indépendantes de p53 sont nécessaires à la prolifération continue (Brooks and Gu, 2009).

- SIRT1 est finement régulée à différents niveaux

Les divers rôles de l'activité désacétylase de SIRT1 dans de nombreux processus cellulaires sont sous le contrôle d'une régulation à plusieurs niveaux. La transcription de SIRT1 est sous le contrôle d'au moins deux boucles de rétrocontrôle négatif ; son induction est finement régulée pendant le stress cellulaire (Brooks and Gu, 2009).

La privation en sérum entraîne la translocation nucléaire du facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box O) activé, qui lie et retire p53 de ses sites de liaison au sein du promoteur de *SIRT1*. Comme p53 réprime l'expression de *SIRT1*, ceci entraîne l'activation transcriptionnelle de ce gène (Kwon and Ott, 2008) (Brooks and Gu, 2009).

P53 est elle-même un substrat de SIRT1 ; sa désacétylation la déstabilise et l'inactive (Kwon and Ott, 2008) (Brooks and Gu, 2009).

SIRT1 est SUMOylée sur sa Lysine 734, ce qui augmente son activité désacétylase. La substitution de cette Lysine par une Arginine non modifiable empêche SIRT1 de désacétyler p53, ce qui protège les cellules de l'apoptose. L'exposition cellulaire à des stress génotoxiques ou oxydatifs augmente l'interaction entre SIRT1 et la protéase SENP1, ce qui induit la désSUMOylation de SIRT1, son inactivation, et promeut l'acétylation de p53 et l'apoptose (Kwon and Ott, 2008).

Etonnamment, le site de SUMOylation de SIRT1 est présent chez de nombreux mammifères, mais n'est pas conservé chez la souris.

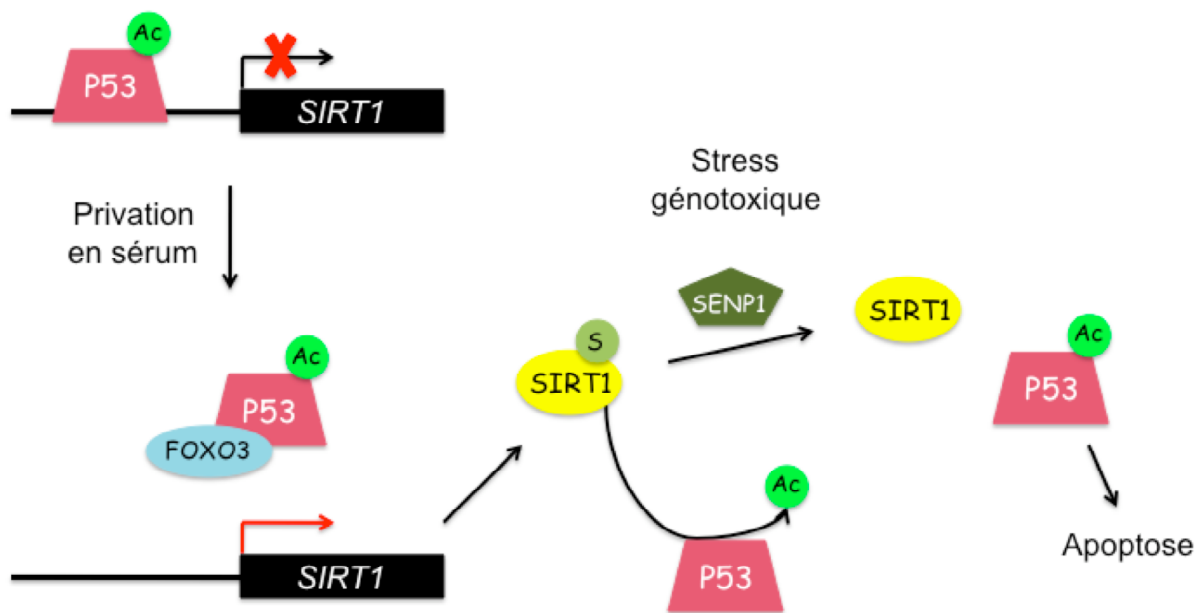


Figure 40 : Régulations croisées de SIRT1 et P53.

E2F1 lie deux sites dans le promoteur de *SIRT1*. Cette protéine est un inducteur de l'apoptose et l'active en réponse à l'augmentation de la prolifération. C'est un activateur crucial de SIRT1 en réponse aux dommages à l'ADN.

Quand l'accumulation de SIRT1 est suffisamment concentrée dans les cellules stressées, elle lie E2F1 et inhibe l'activation de ses gènes par sa désacétylation. Ceci constitue une boucle de rétrocontrôle négatif de *SIRT1* (Wang et al., 2006) (Kwon and Ott, 2008).

Une seconde boucle de rétrocontrôle négatif mise en place par cette protéine et impliquant HIC1 sera décrite ci-après.

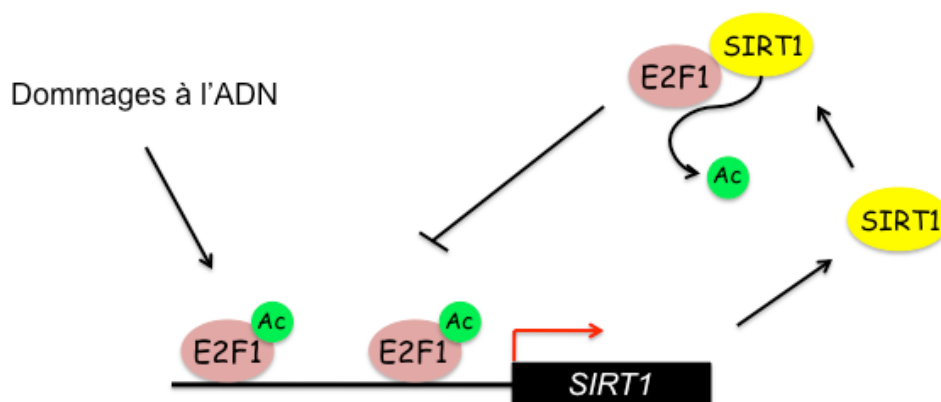


Figure 41 : Rétrocontrôle négatif de *SIRT1* via E2F1.

Une étape de régulation supplémentaire est décrite au niveau du transcrit.

Le gène suppresseur de tumeurs HuR code une protéine de liaison aux ARN messagers (ARNm) qui lie la région non traduite (3'UTR) de l'ARNm de SIRT1 et aide à stabiliser le transcrit. Sa diminution d'expression est corrélée avec celle de SIRT1 dans les cellules sénescences âgées (Kwon and Ott, 2008) (Brooks and Gu, 2009).

Après dommages à l'ADN, la protéine ATR (Ataxia Telangiectasia Related) est activée et initie une voie de signalisation incluant la phosphorylation de la protéine de point de contrôle Chk2. Celle-ci, une fois activée, peut phosphoryler HuR, ce qui cause l'arrêt de la stabilisation de l'ARNm, donc une diminution du taux de SIRT1, promouvant l'apoptose mise en place par p53 (Brooks and Gu, 2009).

MiR-34a lie également le 3'UTR de l'ARNm de SIRT1. Il empêche par contre sa traduction, induisant l'accumulation de la forme acétylée de p53 (Brooks and Gu, 2009).

D. Les boucles de régulation

Deux boucles de régulations, qui ne sont d'ailleurs pas totalement indépendantes, impliquent HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN.

La découverte de l'implication de HIC1 dans les dommages à l'ADN a été faite par l'équipe de S Baylin, grâce à l'étude des souris invalidées pour le gène *Hic1*.

Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *Hic1*^{-/-} sont deux fois plus résistants au traitement à l'étoposide, qui entraîne des cassures doubles brin de l'ADN, que les MEF *Hic1*^{+/+}. Cette équipe a pu observer une diminution des cellules apoptotiques dans les cellules *Hic1*^{-/-}. HIC1 pourrait donc moduler l'apoptose induite par des dommages à l'ADN dans des cellules humaines et murines, et ce de manière dépendante de p53. En effet, la diminution d'expression de p53 rend ces cellules résistantes au traitement à l'étoposide.

La recherche du mécanisme d'action mis en place par HIC1 pour contrôler les dommages à l'ADN via p53 a permis de mettre en évidence l'interaction entre les protéines HIC1 et SIRT1. Le taux d'expression de l'homologue de levure de SIRT1, Sir2, étant important dans la durée de vie de ces organismes, cette équipe a regardé le taux de SIRT1 dans les MEF invalidés ou non pour *Hic1*. Les taux de protéines et d'ARNm SIRT1 augmentent dans les cellules *Hic1*^{-/-}. De plus, l'augmentation d'expression de HIC1 dans des cellules humaines entraîne une diminution du taux de SIRT1, et cet effet n'a pas lieu lorsque la protéine est délétée de son domaine BTB/POZ. Le promoteur du gène *SIRT1* présente deux sites putatifs de liaison à

HIC1, très proches au sein de la séquence et dans la même orientation. Dans des fibroblastes primaires humains WI38, HIC1 se fixe sur ces sites. SIRT1 est également associée à ce site. Les auteurs montrent donc que HIC1 et SIRT1 forment un complexe de répression transcriptionnelle stable qui lie le promoteur de *SIRT1* et réprime directement la transcription.

Dans les cellules mammaires humaines MCF7, un traitement à l'étoposide entraîne une augmentation de p53 de deux fois. L'acétylation de la Lysine 382 de p53, qui, comme nous l'avons vu précédemment, est spécifiquement désacétylée par SIRT1, augmente largement, et ce uniquement dans des cellules avec une expression plus élevée de HIC1 et en présence d'étoposide. SIRT1 et p53 sont donc des effecteurs majeurs pour les réponses apoptotiques aux dommages à l'ADN mises en place par HIC1 (Chen et al., 2005).

Ainsi, une boucle d'auto-régulation peut être établie par SIRT1, impliquant HIC1.

Cette boucle de régulation peut être étoffée grâce à l'étude princeps qui a mené à la découverte de *HIC1*, et qui démontre également que p53 augmente l'expression de ce gène (Wales et al., 1995) (Guerardel et al., 2001).

Une étude plus récente montre que p53 induit *HIC1* via un site consensus de fixation situé à 500 pb en amont du point d'initiation de la transcription du promoteur P0, et que cette région est hautement conservée entre les espèces. P53 endogène est requise pour la transcription de *HIC1* en réponse aux dommages à l'ADN induits par les UV. L'hyperméthylation de la région promotrice de *HIC1* atténue l'induction par p53 (Britschgi et al., 2006).

Sir2, chez la levure, est stimulée par l'augmentation du NAD⁺. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, CtBP, un partenaire essentiel de HIC1, voit son activité affectée par le NAD⁺ et le NADH (le NADH permet sa dimérisation et donc son activité). Ces deux observations ont mené l'équipe de RH Goodman à étudier l'effet potentiel de la glycolyse sur l'action de HIC1, avec l'aide de son corépresseur CtBP, sur *SIRT1* (Zhang et al., 2006) (Zhang et al., 2007).

La mesure directe des concentrations de NAD⁺ et NADH n'est pas possible ; par contre, le ratio NAD⁺/NADH libre cytoplasmique peut être déduit des concentrations de lactate et de pyruvate. Le 2-DG (2-désoxyglucose) est utilisé pour bloquer la glycolyse ; il augmente le ratio NAD⁺/NADH. Etant donné que la concentration de NAD⁺ reste constante, c'est la concentration de NADH qui diminue. Le 2-DG change donc le statut redox des fibroblastes primaires humains.

Dans des cellules traitées au 2-DG, l'interaction entre HIC1 et CtBP est diminuée. Ceci mène à une diminution du recrutement de CtBP au promoteur de *SIRT1*, ce qui est accompagné par l'augmentation du taux de transcrit et de protéine SIRT1. Au sein de cellules exprimant moins HIC1, l'addition de cette protéine diminue le taux de SIRT1 et restaure la réponse au 2-DG ; cet effet est moindre si HIC1 est mutée de manière à ne plus recruter CtBP (Zhang et al., 2007).

L'hypoxie augmente le taux de NADH de 4 fois. Les fibroblastes primaires exposés à l'hypoxie présentent une diminution du taux de transcrit SIRT1. Cet effet est partiellement bloqué par le pyruvate (qui conduit le NADH en NAD⁺) et est complètement reversé par traitement au 2-DG (Zhang et al., 2007).

En plus de la réponse aux dommages à l'ADN, la boucle HIC1-SIRT1-p53 est donc régulée par le métabolisme.

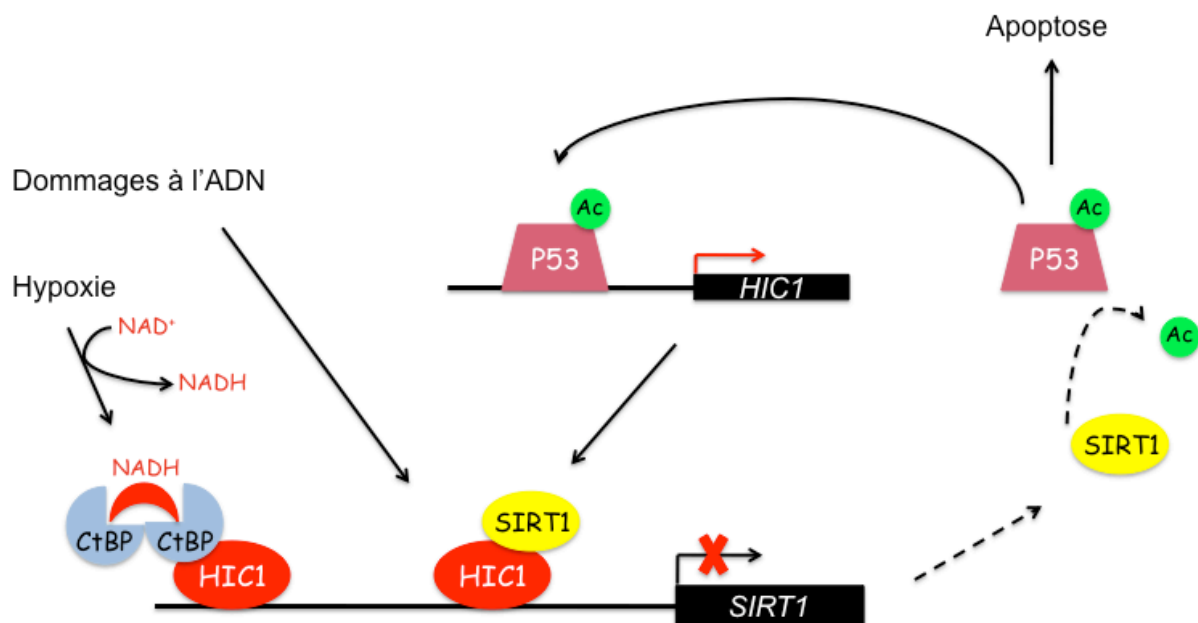


Figure 42 : Boucle de régulation HIC1-SIRT1-p53.

Cependant, *SIRT1* ne serait pas un gène cible de HIC1 dans tous les types cellulaires. Alors que ce fait est bien établi au sein de fibroblastes primaires, il n'en est pas de même dans d'autres situations.

Par exemple, dans les DLBCLs, il n'est pas observé de différence significative du taux d'expression de SIRT1 lorsque sont comparés des cas *HIC1*^{+/+} et des cas *HIC1*^{-/-} (Stocklein et al., 2008).

D'autre part, chez la souris, *Hic1* ne régulerait pas *Sirt1* dans le système nerveux central, puisque le taux de *Sirt1* reste constant lorsque celui de *Hic1* varie. De plus, l'augmentation d'expression de *HIC1* dans une lignée cellulaire humaine de médulloblastome n'affecte pas l'expression de *SIRT1* (Briggs et al., 2008b).

Enfin, au sein de notre équipe, l'infection de cellules dérivées d'ostéosarcome humain U2OS par un adénovirus permettant l'expression constitutive de *HIC1* n'a pas permis d'isoler *SIRT1* en tant que gène cible (Sébastien Pinte, résultats non publiés).

Une seconde boucle de régulation impliquant *HIC1*, facilement mise en relation avec la première, fait intervenir *E2F1*.

Au sein de fibroblastes primaires HSF8, *HIC1* interagit avec l'ATPase du complexe SWI/SNF *BRG1*.

Les complexes SWI/SNF sont connus pour réguler les gènes de la famille *E2F*. Il existe un site consensus de fixation de *HIC1* au sein du promoteur de *E2F1*, et dans des cellules non synchronisées en croissance *HIC1* se trouve sur cette région.

Dans des cellules déficientes en *BRG1*, *HIC1* ne réprime plus ni *SIRT1*, ni *E2F1*. Cette répression est rétablie par ajout de *BRG1*. *BRG1* se trouve au promoteur de *E2F1* si *HIC1* est présente, par contre ceci n'est pas réciproque.

Les gènes *E2F* sont régulés en fonction du cycle cellulaire. Ils sont activés au cours du cycle et réprimés lorsque les cellules sont quiescentes. Les cellules HSF8 cultivées en absence de sérum pendant 72h montrent un arrêt du cycle en phases G0-G1. Ce phénomène n'est pas observé dans les cellules au sein desquelles l'expression de *HIC1* a été inhibée par ARN interférant. *HIC1* se trouve au promoteur de *E2F1* avec *BRG1* dans des cellules en G0, et n'y est plus quand les cellules sont en G1 tardif. Le recrutement de *HIC1* sur *E2F1* est donc spécifique du cycle cellulaire, et ce de manière inversée à la présence de *E2F1* à son propre promoteur (Zhang et al., 2009).

Deux éléments de réponse à *E2F* se trouvent en aval du promoteur P0 (boîte TATA) de *HIC1*. Ces sites sont conservés entre l'Homme, la souris et le rat. *E2F1* est liée à ces sites *in vivo* et cette protéine, grâce à un système inductible par le tamoxifène car couplée au domaine de liaison à l'ADN des oestrogènes (*E2F1-ER*), entraîne une augmentation du taux d'ARNm de *HIC1*.

E2F1 est stabilisée en réponse aux dommages à l'ADN, ce qui induit l'activation de ses gènes cibles. Le traitement de cellules Hep3B (*p53*^{-/-}) à l'étoposide mène à une augmentation des

taux d'ARNm de HIC1, et cette induction est due à E2F1. E2F1 pourrait donc exercer sa fonction apoptotique, au moins partiellement, par l'activation de HIC1, de manière indépendante de p53 (Jenal et al., 2009).

On peut donc établir une nouvelle boucle de régulation entre HIC1 et E2F1. En réponse aux dommages à l'ADN, E2F1 entraîne l'augmentation de HIC1, qui elle-même est capable de réprimer *E2F1*. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, E2F1 active également *SIRT1* après ces mêmes dommages. Ces deux actions sont donc complémentaires et mènent à l'augmentation de l'interaction entre HIC1 et SIRT1 et donc de leur activité, comme par exemple celles démontrées jusqu'alors qui sont la réponse apoptotique et la répression de *SIRT1*, probablement dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif.

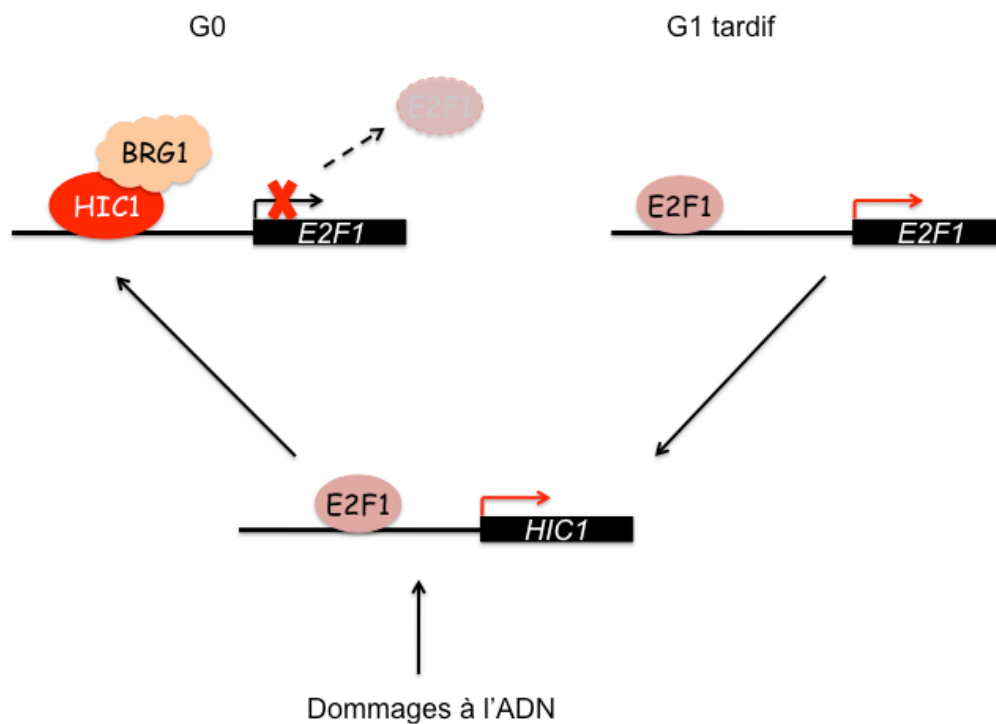


Figure 43 : Boucle de régulation HIC1-E2F1.

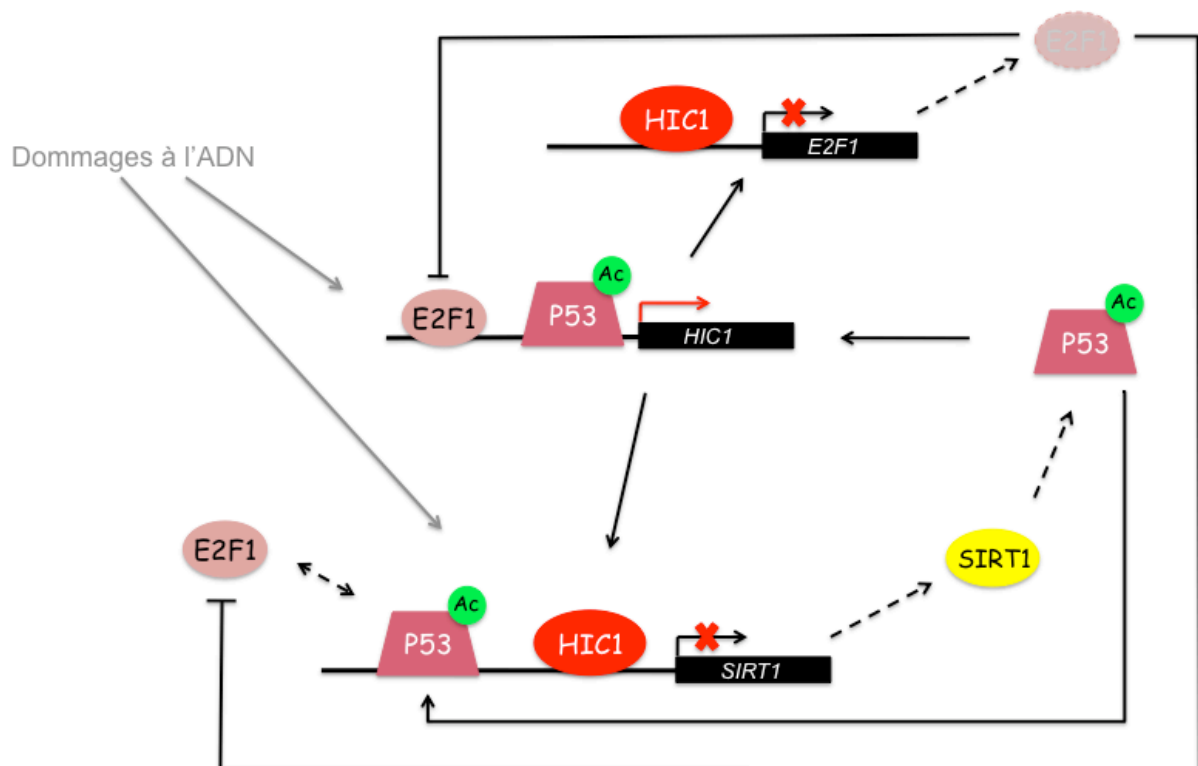


Figure 44 : Schéma récapitulatif général simplifié des boucles de régulation mises en place par HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN.

RESULTATS

I. Introduction

Dans le but de poursuivre l'étude des fonctions de HIC1, un crible double hybride en levure a été mis en place afin de déterminer de nouveaux partenaires.

La protéine chimère appât utilisée est constituée des deux régions répressives autonomes de HIC1, c'est à dire du domaine BTB/POZ couplé à la région centrale (RC). Le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (G4(DBD) pour Gal4(DNA Binding Domain)) a été fusionné en C-terminal pour donner la chimère BTB-RC-G4(DBD). Les modèles de chimères utilisés habituellement, contenant le G4(DBD) en N-terminal de la protéine d'intérêt, ne semblaient pas adéquats pour HIC1. En effet, dans ce cas, nous avons montré que la région centrale est non fonctionnelle car mal conformée (Deltour et al., 2002 ; Stankovic-Valentin et al., 2007). En plaçant ce domaine de liaison à l'ADN en C-terminal, on replace la protéine dans une configuration « normale », puisque le G4(DBD), remplaçant les doigts de zinc, bloque ainsi la région centrale de HIC1 entre deux domaines structurés, comme dans le cas de la protéine de pleine longueur.

Ce crible double hybride a été effectué par la société Hybrigenics. Il a confronté la protéine chimère BTB-RC-G4(DBD) à une banque d'ADN complémentaire de glande mammaire normale, tissu au sein duquel HIC1 est fortement exprimée dans des conditions normales.

Plusieurs clones ont ainsi été identifiés, dont CtBP, permettant de valider ce crible puisque décrit auparavant interagissant avec HIC1.

Afin d'étudier les différents mécanismes de répression transcriptionnelle pouvant être utilisés par HIC1, nous nous sommes tout d'abord intéressés à MTA1. Cette protéine nous a interpellé dans le cadre de ce projet car elle fait partie du complexe de répression transcriptionnelle NuRD.

Nous avons également étudié l'interaction entre HIC1 et un autre partenaire potentiel, BCL11A. En effet, cette protéine, ainsi que son homologue BCL11B, ont été décrites interagissant avec BCL6 d'une part, et d'autre part avec le complexe NuRD, laissant supposer une relation avec MTA1 dans le contexte de HIC1.

De plus, une collaboration de notre équipe avec celle de S Wang, portant sur le recrutement des complexes SWI/SNF par HIC1 au niveau du promoteur de *E2F1*, nous a mené à étudier l'interaction de cette protéine avec ARID1A, un membre caractéristique d'un sous-type de complexes SWI/SNF responsable de la mise en place d'une répression de la transcription.

Enfin, ayant émis l'hypothèse que, comme dans le cas de BCL6, différents complexes de répression transcriptionnelle puissent être utilisés par HIC1 pour réprimer différents gènes cibles, j'ai contribué à l'étude de ces gènes, et notamment de l'un de ceux-ci identifié quelques années auparavant par Sébastien Pinte au cours de sa Thèse, *CXCR7*.

II. Publication n°1

Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an Acetylation/SUMOylation Switch, in quiescent versus proliferating cells

Capucine VAN RECHEM, Gaylor BOULAY, Sébastien PINTE, Nicolas STANKOVIC-VALENTIN, Cateline GUERARDEL et Dominique LEPRINCE.

En révision à *Molecular and Cellular Biology*.

Bien que la modification de HIC1 par SUMOylation ait été décrite par notre équipe (Stankovic-Valentin et al., 2007), son mécanisme de fonctionnement n'avait pas encore été identifié. Cette modification, qui potentialise l'activité de répression transcriptionnelle mise en place par la région centrale de HIC1, s'effectue sur une Lysine pouvant également être acétylée. De ce fait, cette première étude a permis de définir un nouveau site consensus de permutation acétylation/SUMOylation indépendant de la phosphorylation, de type $\Psi KxEP$.

Dans la présente étude, nous mettons en évidence le mécanisme de fonctionnement de cette permutation. En effet, la SUMOylation de la Lysine 314 de HIC1 favorise le recrutement de MTA1, un membre du complexe NuRD de remodelage des nucléosomes et désacétylation des histones, alors que l'acétylation l'inhibe.

L'étude du recrutement de MTA1 par HIC1, sur ses gènes cibles déjà identifiés, ainsi que sur deux autres, caractérisés au cours de ce travail, a permis de mettre en évidence deux points importants.

Tout d'abord, le recrutement du complexe NuRD aux gènes cibles de HIC1 s'effectue en fonction de l'état de croissance des cellules, donc en fonction du cycle cellulaire. Deux nouvelles cibles, impliquées dans ce cycle, ont été identifiées, *p57KIP2* et *Cycline D1*.

De plus, ce travail a permis de caractériser un nouveau site de fixation de HIC1, HiRE, au sein du promoteur de *SIRT1*, premier gène cible direct décrit pour cette protéine. Là encore, le recrutement sur ce site ainsi que sur ceux précédemment décrits est fonction de l'état de croissance des cellules. Ces sites sont mutuellement exclusifs, et les modifications épigénétiques mises en place ne sont pas identiques. Notre travail a donc mis en évidence un niveau supplémentaire de régulation du gène codant la désacétylase de classe III *SIRT1*, largement décrite comme étant impliquée dans les cancers et la longévité.

1 **Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD,**
2 **via an Acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus**
3 **proliferating cells.**

4

5

6 **Capucine Fleuriel¹, Gaylor Boulay¹, Sébastien Pinte¹, Nicolas Stankovic-**
7 **Valentin^{1,2}, Celine Guérardel¹ and Dominique Leprince^{1,3}**

8

9 Running title: HIC1 regulates genes involved in growth control

10

11 Keywords: HIC1, MTA1, NuRD complex, SIRT1, SUMOylation, Acetylation,
12 Transcriptional repression, 17p13.3.

13

14 (1) CNRS UMR 8161 «Institut de Biologie de LILLE », Université Lille Nord de
15 France, Institut PASTEUR de LILLE, IFR 142, 1 Rue Calmette, 59017 LILLE
16 Cedex, France.

17 (2) ZMBH, Im Neuenheimer Feld 282, 69120 HEIDELBERG, GERMANY

18 (3) Correspondence : dominique.leprince@ ibl.fr

19

20

21 Abstract = 150 words.

22 Abstract, Introduction, Results, Discussion and Figure Legends = 29857
23 characters excluding spaces.

24 Materials and Methods = 5617 characters excluding spaces.

25

Abstract

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

The tumor suppressor gene *HIC1* encodes a transcriptional repressor involved in regulatory loops modulating P53-dependent and E2F1-dependent cell survival, growth control and stress responses. Despite its importance few HIC1 corepressors (CtBP and Brg1) and target genes (*SIRT1*, *ATOH1* and *E2F1*) have been characterized. Here we identify MTA1, a subunit of the NuRD complex, as a new HIC1 corepressor. This interaction is regulated by two competitive post-translational modifications of HIC1 at Lysine 314, promotion by SUMOylation and inhibition by acetylation. Consistent with the role of HIC1 in growth control, we demonstrate that HIC1/MTA1 complexes are bound in quiescent WI38 cells on two new target genes, *CyclinD1* and *p57Kip2* and on a new evolutionarily conserved HIC1 binding site in the *SIRT1* promoter, specifically enriched with repressive histone marks. Our results demonstrate a mechanistic link between two competitive post-translational modifications of HIC1 and transcriptional repression through gene-specific corepressor recruitment, leading to growth control.

Introduction

40

41

42 *HIC1* (*Hypermethylated in Cancer 1*) a tumor suppressor gene frequently deleted or
43 epigenetically silenced in human cancers, encodes a transcriptional repressor (6-8) (13) (35).

44 A regulatory feed-back loop between HIC1 and P53 has been deciphered. *HIC1* is a direct
45 target gene of P53 transactivation through a P53-responsive element (5) (15) (35). HIC1
46 directly represses transcription of *SIRT1*, a NAD⁺-dependent Class III HDAC which
47 deacetylates and inactivates P53, thereby modulating P53-dependent DNA-damage responses
48 (8). We have shown that SIRT1 also deacetylates HIC1. However, in striking contrast with
49 P53, this deacetylation activates HIC1 by strengthening its transcriptional repression potential
50 (31).

51 Aside from P53, SIRT1 and HIC1 have also been implicated in a feedback regulatory loop
52 with E2F1. E2F1 is a crucial activator of *SIRT1* transcription in response to DNA-damage but
53 SIRT1 binds E2F1 and deacetylates it thus inhibiting E2F1-mediated gene activation (18)
54 (36). E2F1 also directly activates *HIC1* (Jenal et al., in press) and HIC1 directly represses the
55 *E2F1* promoter in quiescent but not in growing late G1 human fibroblasts through interaction
56 with Brg1, an ATPase of the SWI/SNF complexes (39). Therefore, HIC1 contributes to the
57 growth suppression induced by serum deprivation (39). Collectively, these data place HIC1 at
58 the intersection point for complex regulatory loops modulating p53-dependent and E2F1-
59 dependent cell survival, growth control and stress responses.

60 *HIC1* encodes a sequence-specific transcriptional repressor with five *Krüppel*-like C₂H₂ zinc
61 fingers mediating DNA binding to a HIC1 responsive element (HiRE) consisting of a 5'-
62 ^C/_GNG^C/_GGGGCA^C/_ACC-3' sequence centered on a GGCA motif (26). To date, *SIRT1*, *E2F1*
63 and *ATOH1*, a proneuronal transcription factor identified in two animal models of
64 medulloblastoma (4) are the only characterized direct target genes of HIC1.

65 Our earlier work demonstrated that HIC1 contains two autonomous repression domains, an
66 N-terminal BTB-POZ domain capable of autonomous transcriptional repression (10) and a
67 central region that recruits CtBP co-repressor complexes through a conserved GLDLSKK
68 motif (11) (30). Notably, hypoxia promotes the association of HIC1 with CtBP (30) whereas
69 inhibition of glycolysis by 2-deoxyglucose decreases it (40). Thus, through its interaction
70 with the redox sensor CtBP, HIC1 can specifically link *SIRT1* expression to free nuclear
71 NADH levels. SIRT1 positively regulates HIC1 repressive activity by orchestrating in
72 collaboration with HDAC4 a switch between acetylation and SUMOylation, two reversible
73 post-translational modifications competitively targeting lysine K314 in the conserved
74 $\psi\text{K}^{314}\text{xEP}$ motif (31). Despite its functional importance, the mechanistic details including
75 corepressor recruitment and gene-specific regulation through this acetylation/SUMOylation
76 switch are not known.

77 In this study we identified, by yeast two hybrid screening, MTA1 as a novel
78 corepressor for HIC1. The MTA family of proteins consists of evolutionarily conserved
79 integral subunits of the NuRD (Nucleosome Remodeling and histone Deacetylase) complex
80 (17). We show that HIC1 interacts with MTA1 in WI38 fibroblasts and recruits it to the
81 *SIRT1* promoter. We further demonstrate that the acetylation/SUMOylation switch on K314
82 regulates the interaction with MTA1. Indeed, SUMOylation-deficient or constitutively
83 acetylated mutants exhibited significantly reduced binding to MTA1 and a decreased
84 repression potential. Consistent with the role of HIC1 in growth control, we demonstrate that
85 CtBP and NuRD complexes are differentially recruited on known HIC1 target genes in
86 quiescent versus growing WI38 cells. In particular, HIC1/MTA1 complexes co-occupy the
87 promoters of two new direct target genes, *Cyclin D1* and *p57KIP2*, only in quiescent cells.
88 Furthermore, HIC1/CtBP and HIC1/MTA1 complexes are also differentially bound on two
89 mutually exclusive HIC1 binding sites on the *SIRT1* promoter in quiescent versus

90 proliferating WI38 cells. Notably, the evolutionarily conserved HiRE identified in this study
91 is specifically enriched with repressive histone marks in quiescent cells.

Results

92

93

94 **HIC1 interacts with MTA1 and the NuRD complex *in vivo*.**

95

96 To explore in more detail the HIC1 mediated repression mechanisms acting on its
97 target genes in quiescent cells, we first searched for novel HIC1 corepressors by yeast two-
98 hybrid screening using the two autonomous repression domains of HIC1 (residues 1-422) as
99 bait. One clone and three clones contained the complete coding sequences of human CtBP1
100 and CtBP2 respectively, in close agreement with our previous work (11, 30). We also isolated
101 two clones corresponding to residues 397-473 of MTA1 (Metastasis-associated protein 1) an
102 integral subunit of the NuRD (Nucleosome Remodeling and histone Deacetylase) complex
(3) (12) (17) (23, 24) (Figure 1A and 1B).

103

104 To confirm this interaction, we performed co-immunoprecipitation analyses in
105 transiently transfected HEK293T cells. Myc-MTA1 was coprecipitated by FLAG-HIC1
106 demonstrating that full-length HIC1 and MTA1 proteins associate *in vivo* (Figure 1C).
107 Furthermore, in total cell extracts from WI38 fibroblasts, MTA1 was immunoprecipitated by
108 anti HIC1 antibodies but not by normal rabbit immunoglobulins (Figure 1D).

109

110 NuRD complexes share a core HDAC/RbAp complex with the Sin3 complex but
111 contain specific subunits including MTA1/2 and MBD3 (Figure 1B) (12) (21) (23). In
112 contrast, the NODE complex (Nanog and Oct4 associated deacetylase) contains HDAC1/2
113 and MTA1/2 but not MBD3 (22). By co-immunoprecipitation, we also detected an interaction
114 between endogenous HIC1 and endogenous MBD3 (Figure 1E and Supplementary Figure 1),
115 thus demonstrating that HIC1 interacts with canonical NuRD complex.

114

115 Finally, by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in WI38 fibroblasts, we
demonstrated that endogenous HIC1 and MTA1 proteins are bound to the two adjacent HiRE

116 (HIC1 responsive element) in the *SIRT1* promoter (8) a direct HIC1 target gene in human
117 fibroblasts (8) (39, 40) (Figure 1F).

118 Taken together, these findings demonstrate that HIC1 recruits the NuRD complex
119 *in vivo* to the promoter of *SIRT1* via an interaction with MTA1.

120

121 **HIC1 recruits NuRD independently of CtBP.**

122 Previously, we demonstrated that the HIC1 central region is a TSA-sensitive
123 repression domain relying on both CtBP-dependent and CtBP-independent mechanisms (11)
124 (30). The CtBP repressor complex is a huge complex mediating several coordinated histone
125 modifications (9) (29). To determine whether the recruitment of the CtBP and NuRD
126 complexes by HIC1 could be somehow linked, we performed co-immunoprecipitation
127 experiments with a mutant unable to recruit CtBP, HIC1 L225A (30). This CtBP-deficient
128 mutant displayed a comparable ability to complex with MTA1 as its wild-type counterpart
129 (Figure 2A, compare lanes 6 and 7). Thus, the interaction of the CtBP and NuRD complexes
130 with HIC1 appears to be independent. We can also infer that CtBP does not interfere by steric
131 hindrance with the recruitment of the NuRD complex.

132

133 **SUMOylation of HIC1 on lysine 314 positively regulates the interaction with MTA1.**

134 An Acetylation/SUMOylation switch motif, $\psi\text{K}^{314}\text{xE}^{316}\text{P}$, positively regulates
135 HIC1 transcriptional repression potential by an unknown mechanism (31). In striking contrast
136 with the L225A CtBP-deficient point mutant, the K314R SUMOylation-deficient mutant is
137 severely impaired in its interaction with MTA1, thus demonstrating that this interaction may
138 be regulated by the SUMOylation status of HIC1 (Figure 2A, lane 8).

139 To augment these results, we also tested the FLAG-HIC1 E316A mutant since this
140 point mutation in the ψKxE consensus motif abolishes the SUMOylation of target proteins, as

141 demonstrated for HIC1 (31). Consistent with the results obtained with the K314R point
142 mutant, this second SUMOylation-deficient mutant is also impaired in its interaction with
143 MTA1 (Figure 2B).

144 Thus, these results demonstrate that SUMOylation of HIC1 on K314 promotes the
145 interaction with MTA1.

146

147 **Acetylation of HIC1 on Lysine 314 disrupts the interaction with MTA1 and impairs**
148 **HIC1's transcriptional repression potential.**

149 Since K314 is competitively modified by acetylation or SUMOylation (31), we
150 asked whether these two mutually exclusive post-translational modifications could play
151 opposite roles in regulating the interaction between HIC1 and MTA1. We thus constructed
152 the K314Q mutant in which the lysine K314 residue is substituted by glutamine to mimic a
153 constitutively acetylated lysine (1) (34). This K314Q mutant, unlike wild-type HIC1 or to a
154 lesser extent the SUMOylation-deficient mutants, is unable to significantly interact with
155 MTA1 (Figure 2C). By contrast, the K314Q mutant appears unaffected in its ability to
156 interact with CtBP2 (Figure 2D) thus confirming that the recruitment of the CtBP and NuRD
157 complexes are independent. Thus, the K314Q mutation mimicking constitutive acetylation
158 does not globally affect the HIC1 central region but specifically inhibits the recruitment of
159 MTA1.

160 To monitor the impact of this K314Q mutation on the transcriptional repression
161 potential of HIC1, we performed transient luciferase reporter assays using various HIC1-
162 Gal4-fusions and a 5xGal4-tk-luc reporter plasmid. In this functional assay, the constitutively
163 acetylated K314Q BTB-RC-Gal4 chimera repressed transcription almost 5-fold less
164 efficiently than did wild-type HIC1 (Supplementary Figure 2). Comparatively, the

165 SUMOylation-deficient mutants repressed it approximately 2.5-fold less than wild-type
166 HIC1, as previously described (31).

167 Collectively, these data demonstrate that the acetylation/SUMOylation switch on
168 K314 regulates the transcriptional repression activity of HIC1 since acetylation decreases the
169 association of HIC1 and MTA1 and hence of the NuRD complex, whereas SUMOylation
170 promotes it.

171

172 **MTA1, HIC1 and the SIRT1/HDAC4 complex are co-localized on HIC1 target genes**

173 Our previous finding that the Acetylation/SUMOylation switch on HIC1 K314
174 relies on a complex between SIRT1 and HDAC4 (31) raised the question of whether these
175 proteins are present together with MTA1 on HIC1 target genes. To that end, we performed
176 sequential ChIP upon ChIP experiments in WI38 cells consisting of a first round of chromatin
177 immunoprecipitation with HIC1 antibodies followed by elution of the complex and a second
178 round of immunoprecipitation with various antibodies. SUMOylation is a highly dynamic and
179 reversible post-translational modification (16) (33). Thus, to optimize detection of
180 SUMOylated proteins, we used WI38 cells synchronized in late G1 (Figure 3B). As shown in
181 Figure 3A, HIC1, MTA1, SIRT1 and HDAC4 are specifically bound together with
182 SUMOylated proteins on the *SIRT1* promoter (8) and on two adjacent HiRE in the conserved
183 3' enhancer of the human proneuronal transcription factor *ATOHI*, identified as a HIC1 target
184 gene in mouse models of medulloblastoma (4). As expected, no binding is observed on the
185 *E2F1* promoter, which is directly repressed by HIC1 but only in quiescent cells through
186 recruitment of Brg1, an ATPase of the SWI/SNF complexes (39).

187 In conclusion, our results suggest that a SUMOylation/MTA1-dependent pathway
188 is used by HIC1 to repress some target genes.

189

190 **HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes are differentially recruited on the**
191 **three known HIC1 target genes, *SIRT1*, *E2F1* and *ATOH1***

192 To investigate the role of the HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes in the
193 growth arrest induced by serum deprivation, we prepared a G0 cell population and a late G1
194 cell population of WI38 fibroblasts by serum starvation (72 hours) and release (10 hours)
195 respectively (Figure 3B). As controls, we observed higher levels of Proliferating Cell Nuclear
196 Antigen (PCNA) and of the G1 specific cyclin, Cyclin D1 in our late G1 cell population than
197 in quiescent cells (inset in Figure 3B). Chromatins were prepared from these two cell
198 populations and analyzed by ChIP upon ChIP experiments through a first round of chromatin
199 immunoprecipitation with HIC1 antibodies and a second round of immunoprecipitation with
200 antibodies against MTA1, CtBP1 or normal rabbit IgG. In quiescent cells, co-localized HIC1
201 and CtBP signals were not detected on the promoters of the 3 known HIC1 target genes
202 (*SIRT1*, *ATOH1* and *E2F1*) whereas HIC1/MTA1 complexes bound only the *ATOH1*
203 enhancer (Figure 3C, left panel). In growing late G1 WI38 cells, the situation was similar for
204 *ATOH1* but strikingly different for the *SIRT1* promoter where HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP
205 complexes are both detected on the previously described HiRE in line with single ChIP
206 findings for HIC1 and CtBP (8) (40). As expected no binding was observed on *E2F1* in G1
207 growing cells nor in quiescent cells suggesting that the repression of *E2F1* in G0 relied on
208 Brg1-containing SWI/SNF complexes (39).

209 Thus, HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes are differentially recruited to
210 subsets of HIC1 target genes in normal fibroblasts depending of the G0 or G1 stages of the
211 cell cycle.

212

213

214 **Cyclin D1 and P57Kip2 are new direct target genes of HIC1/MTA1**
215 **complexes in quiescent cells.**

216 Based on these results, we searched for sequences perfectly matching the HIC1
217 consensus binding site (26) in the promoter regions of key players in the G0-G1 transition.
218 These *in silico* analyses identified HiREs in the promoters of *cyclin D1*, a key sensor and
219 integrator of extracellular signals of cells in the early to mid-G1 phase and of the *P57Kip2*
220 gene, which encodes an inhibitor of some Cyclin/Cdk complexes, exclusively expressed in
221 G1 (Supplementary Figures 3 and 4) (2). Indeed, the consensus HIC1 binding site in the
222 *Cyclin D1* promoter around position -1623 is bound by HIC1 proteins in *in vitro* gel
223 retardation assays (Supplementary Figure 3). When we analyzed the chromatins of quiescent
224 versus late G1 WI38 cells, we found that the HiRE sites in *Cyclin D1* and *P57Kip2* are
225 occupied by HIC1/MTA1 but not by HIC1/CtBP in quiescent cells. In late G1 growing cells,
226 neither of these two HIC1 repressive complexes are observed on *Cyclin D1* and *P57Kip2* in
227 line with the expression of these proteins during this phase of the cell cycle.

228 Collectively, these ChIP upon ChIP data demonstrate that *Cyclin D1* and *P57Kip2*
229 are two new direct target genes of HIC1/MTA1 complexes, but only in quiescent cells.

230

231 **HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes are present on mutually exclusive**
232 **sites on the *SIRT1* promoter in quiescent versus growing cells.**

233 The fact that the level of SIRT1 increases when serum starved human lung
234 fibroblasts or normal MEFs are stimulated with serum (28) (Figure 5D), coupled with the lack
235 of HIC1/CtBP and HIC1/MTA1 complexes on the previously described HiRE (8) (40) in the
236 *SIRT1* promoter in quiescent cells contrasted with their presence in growing cells, presented a
237 conundrum (Figure 3C).

238 However, a reappraisal of these sites by phylogenetic foot-printing of the human,
239 murine and rat *SIRT1* genes demonstrates that even though their arrangement is grossly
240 conserved, their sequences and localizations are highly divergent (Figure 4). Upon closer
241 inspection of the *SIRT1* promoters, we identified a new putative HIC1 binding site located at
242 position -8, close to the transcription initiation site and downstream of a conserved E2F1
243 binding site (36). Notably, this “proximal” -8 HiRE site is also perfectly conserved in the
244 three *SIRT1* genes in striking contrast with the “distal” -1116 and -1039 HIC1 binding sites
245 (8) (Figure 4).

246 When we analyzed by sequential ChIP, the presence of HIC1/MTA1 and
247 HIC1/CtBP repressive complexes on these two types of HiRE in the *SIRT1* promoter, an
248 exactly inverse correlation was observed in quiescent versus late G1 WI38 cells. Indeed, in
249 quiescent cells both HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes are bound to the
250 phylogenetically conserved proximal HiRE but not to the distal sites. Conversely, in
251 proliferating cells, these two repressive complexes are found on the distal HiRE sites but not
252 on the proximal site of the *SIRT1* promoter (Figure 5A).

253 In conclusion, our results demonstrate that HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP
254 repressive complexes bind to mutually exclusive sites in the *SIRT1* promoter depending on
255 whether the human WI38 fibroblasts are quiescent or proliferating.

256

257 **Silencing histone modifications, hypoacetylated H4K16 and H3K27me3, are**
258 **enriched at the proximal HiRE of the *SIRT1* promoter in quiescent WI38 cells.**

259 Given that SIRT1 levels are lower in quiescent cells (28), we asked whether
260 silencing histone modifications could be specifically enriched on this new “proximal” HIC1
261 responsive site of the *SIRT1* promoter as a consequence of stable repression mechanisms. To
262 that end, we performed single ChIP assays for various histone modifications considered as

263 activating (H4K16ac) or as repressive marks (H3K9me2, H3K9me3 and H3K27me3) with
264 chromatins from quiescent or late G1 growing WI38 cells. As expected, these experiments
265 highlighted major changes on the regions encompassing the two types of HiRE in the *SIRT1*
266 promoter although we failed to detect any H3K9me2 and H3K27me2 epigenetic marks (data
267 not shown). In quiescent WI38 cells, the distal HIRE are devoid of repressive histone marks
268 but enriched with activating marks such as acetylated H4K16. By contrast, two typical
269 repressive marks, namely hypoacetylated H4K16 and H3K27me3 are found on the
270 “proximal” promoter in quiescent cells (Figures 5B and 5C). The presence of H3K27me3 on
271 this region could be related to the recruitment of NuRD complexes by HIC1, since NuRD has
272 been shown to facilitate *Polycomb* binding (25).

273 When cells are replenished with serum and allowed to grow, the repressive marks
274 are lost on the proximal promoter as shown by the lack of H3K27me3 and the reappearance
275 of acetylated H4K16 (Figures 5B and 5C). On the distal HIRE, the presence of H3K9me3 is
276 not due to the H3K9 methyltransferases, G9a and GLP/EuHMTase 1 associated with the
277 CtBP complex recruited by HIC1 on this region since they are only able to mono- and
278 dimethylate H3K9 (29) (32). Of note, whereas the level of HIC1 proteins remains constant,
279 the level of SIRT1 protein expression is significantly lower in quiescent cells (28) (Figure
280 5D) when the proximal HIC1 binding site is associated with gene silencing epigenetic marks.

281 Our results reveal a new layer in the complex cellular regulation of *SIRT1* through
282 the identification of a new conserved HIC1 binding site specifically enriched for histone
283 silencing marks only in quiescent cells.

284

Discussion

285

286

287

288

289

In this report, we have established connections between two competitive post-translational modifications on HIC1 K314, acetylation and SUMOylation and the differential recruitment of NuRD repressive complexes in quiescent cells on two novel HIC1 target genes *CyclinD1* and *p57Kip2* and on a novel proximal HIC1 binding site in *SIRT1*.

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

SUMOylation is a central mechanism regulating activity of transcription factors (37). HIC1 is one among few examples where a lysine is competitively modified by acetylation and SUMOylation to modulate its transcriptional repression potential (31). Our data identify MTA1 as a novel HIC1 corepressor, regulated through this switch mechanism. MTA1, MTA2 and the related MTA3 proteins are mutually exclusive, specific subunits of the NuRD complex. Their homologous N-terminal parts contain several functional domains interacting with core complex components (27). Their more divergent C-terminal parts are involved in specific interactions with small motifs found in transcriptional repressors. For example, BCL6 interacts with MTA3 through a central KKYK³⁷⁹ motif (1) (14) whereas FOG1/2 (Friend of GATA), BCL11B and members of the Sal1 family interacts with MTA1 through an N-terminal MSRRKQxKP motif (19). These motifs are highly divergent but a common theme is their regulation by post-translational modifications. Indeed, phosphorylation by PKC of Serine 2 in the Sal1 motif impairs its interaction with MTA1 (20). Similarly, p300-mediated acetylation of K379 in the KKYK³⁷⁹ motif abolishes the interaction with the cell-type specific MTA3 subunit, which is indispensable for BCL6 to repress genes involved in plasma cell differentiation (14). HIC1 is thus unique since the interaction with MTA1 is impaired by p300-mediated acetylation of K314 and favoured by its deacetylation/SUMOylation induced by a SIRT1/HDAC4 dual-deacetylase complex (31).

308 As a transcription factor recruiting several corepressors proteins, HIC1 could
309 control different biological functions through distinct biochemical mechanisms. When we
310 addressed the role of HIC1 on growth control through ChIP upon ChIP experiments, we
311 demonstrated that HIC1/MTA1 and HIC1/CtBP complexes are differentially recruited in
312 quiescent and normal growing cells on *SIRT1* and *ATOH1* but are not found on the *E2F1*
313 promoter. By contrast, HIC1/MTA1 complexes are specifically bound in quiescent cells on
314 HIC1 binding sites identified by *in silico* analyses in the promoters of two key regulators of
315 the G1 phase, *CyclinD1* and *P57Kip2*. Thus, our results identify a new link between HIC1
316 and cell growth through its post-translational modifications which regulate the specific
317 recruitment of NuRD complexes to *CyclinD1* and *P57Kip2*. This mechanism may extend to
318 other growth control regulators since *HIC1* is highly expressed in normal tissues and primary
319 cells but rapidly inactivated in the first steps of tumorigenesis (35).

320 *SIRT1*, the first *bona fide* HIC1 target gene characterized (8), is a key regulator of
321 cancer, senescence, metabolism and longevity. *SIRT1* is involved in an intricate network of
322 transcriptional and post-translational regulations, notably with P53, E2F1 and HIC1. The two
323 adjacent HIC1 binding sites (HiRE) previously described in the *SIRT1* promoter have been
324 implicated in the P53-dependent response to DNA-damage after etoposide treatment (8) and
325 in the response to glycolysis inhibition through the redox sensor CtBP (40). Our ChIP upon
326 ChIP analyses in growing (late G1) WI38 fibroblasts have confirmed these results and have
327 further demonstrated the presence of HIC1/MTA1 complexes which can be recruited together
328 with CtBP (Figures 2 and 3C). However, these HiRE sites are not well conserved in rodent
329 genomes. By contrast, we have identified a new proximal HiRE which is evolutionarily
330 conserved and bound by MTA1 and CtBP complexes in quiescent cells with the concomitant
331 appearance of stable epigenetic repressive marks, hypoacetylated H4K16 and H3K27me3.
332 Therefore, we propose that these two types of HIC1 binding sites may perform different

333 functions. The distal HiRE could participate in a dynamic species-specific fine-tuning of
334 *SIRT1* expression in growing cells to counterbalance the increase in *SIRT1* expression
335 induced by metabolic stress or by E2F1 after genotoxic stress. Similarly, SIRT1 deacetylase
336 activity is increased by SUMOylation in many mammals but not in mice due to a K to R
337 mutation in the SUMOylation consensus (38). By contrast, the proximal HIRE could be
338 generally used to stably lock *SIRT1* transcription when cells cease to divide due to cell cycle
339 withdrawal.

340 **Materials and methods**

341

342 **Yeast Two-hybrid screen**

343 Y2H screening was performed by Hybrigenics, Paris, France (<http://www.hybrigenics.com>).

344 For bait cloning, the BTB-Central Region of HIC1 (1-422) encompassing the two
345 autonomous repression domains was PCR-amplified and cloned in frame with a C-terminal
346 LexA DNA-Binding domain in a Y2H vector. The bait construct was checked by sequencing
347 the insert and was transformed in the L40 Δ GAL4 yeast strain.

348 A Human Breast Tissue random-primed cDNA library, transformed into the Y187 yeast strain
349 and containing ten million independent fragments, was used for mating. Neither toxicity nor
350 autoactivation of the bait was observed in small scale pre-screens. Then, the full-scale screen
351 was performed in conditions ensuring a minimum of 50 million interactions tested, to cover
352 five times the primary complexity of the yeast-transformed cDNA library. 79 millions of
353 interactions were actually tested with HIC1. After selection on medium lacking leucine,
354 tryptophane, and histidine, positive clones were picked, and the corresponding prey fragments
355 were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions.

356

357 **Cell lines, Plasmids and antibodies**

358 HEK293T, SW480 and RK13 cells were maintained in DMEM medium (Gibco)
359 supplemented with 10% fetal calf serum and non essential amino acids. WI38 were purchased
360 from ATCC (14 passages) and cultured in MEM medium (Gibco) supplemented with 10%
361 fetal calf serum, non essential amino acids and sodium pyruvate. The pTL1 HIC1, pcDNA3-
362 FLAG-HIC1, pcDNA3-FLAG-HIC1 L225A, K314R and E316A expression vectors have
363 been previously described (11) (31). The plasmid encoding a Myc-tagged MTA1 has been
364 kindly provided by Dr Rakesh Kumar (MD Anderson Cancer Center, Houston). The pcDNA3

365 FLAG-HIC1 K314Q vector was derived from the wild-type FLAG-HIC1 vector by PCR
366 mutagenesis and verified by nucleotide sequencing.

367 Except for the anti-HIC1 2563 and anti-HIC1 325 polyclonal antibodies (11), commercial
368 antibodies of the following specificity were used: FLAG from Sigma (M2 monoclonal
369 antibody F3165); MTA1 from Santa Cruz (goat polyclonal antibodies sc-9445 for WB and
370 mouse monoclonal sc-17773X for ChIP); MBD3 from IBL, Gunma, Japan (mouse
371 monoclonal antibodies 10281); MYC Tag from Tebu (mouse monoclonal 51826); CtBP2
372 from BD Biosciences (mouse monoclonal 612044); SUMO1 from Santa cruz (sc9060 rabbit
373 polyclonal); Cyclin D1 from Cell signaling (mouse monoclonal 2926); SIRT1 from Delta
374 Biolabs (rabbit polyclonal DB083 for WB) and from Upstate (mouse monoclonal 05-707 for
375 ChIP); HSP60 from Santa Cruz (sc13115); CtBP1 from Santa Cruz (rabbit polyclonal
376 sc9060); PCNA from Dako (mouse monoclonal M0879); H4K16Ac (rabbit polyclonal 07-
377 329), H3K9me2 (rabbit polyclonal 07-441), H3K27me2 (rabbit polyclonal 07-452) and
378 H3K27me3 (rabbit polyclonal 07-449) from Upstate; H3K9me3 (rabbit polyclonal ab8898)
379 from Abcam.

380

381 **Transfection, Co-immunoprecipitation and repression assays**

382 Cells were transfected in OptiMEM (Gibco) by the PEI (Euromedex) method as previously
383 described in either 100 mm diameter dishes (*in vivo* interaction in HEK293T cells) with
384 2,5µg of DNA or in 12 wells plates (repression assays) with 525 ng of DNA for RK13 cells
385 (30). Cells were transfected for 6 hours and then were incubated in fresh complete medium.
386 For co-immunoprecipitation assays, 48H after transfection, cells were rinsed two times in
387 cold PBS and lysed in cold IPH buffer (50mM Tris pH8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5%
388 NP-40, protease inhibitor cocktail (Roche)). Cell lysates were cleared by centrifugation
389 (14000 rpm, +4°C for 30 min). The supernatants were incubated overnight with 2 µg of

390 antibody. Then, protein A-G Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added for 30
391 min. The beads were washed 3 times with IPH buffer. Proteins were eluted by boiling in
392 Laemmli loading buffer and separated by SDS/PAGE before Western blotting.

393 For repression assays, 48H after transfection, cells were rinsed in PBS and lysed with the Luc
394 assay buffer (25mM glycylglycine pH7.8; 15mM MgSO₄; 4mM EGTA; 1% Triton X-100).
395 Luciferase and β -galactosidase activities were measured by using, respectively, beetle
396 luciferin (Promega) and the Galacto-light kit (Tropix) with a Berthold chemiluminometer.
397 After normalization to β -galactosidase activity, the data were expressed as Luc activity
398 relative to the activity of pG5-Luc with empty control vector, which was given an arbitrary
399 value of 1. Results represented are the mean values and standard deviations from two
400 independent transfections in triplicate.

401

402 **Western Blot**

403 Western blots were performed as previously described (11). The secondary antibodies were
404 horseradish peroxidase-linked antibodies raised against rabbit, goat or mouse
405 immunoglobulins (Amersham).

406

407 **Chromatin Immunoprecipitation**

408 ChIP was performed according to published protocols with slight modifications. Briefly,
409 formaldehyde was added directly to the cultured cells to a final concentration of 1% for 10
410 min at 37°C. The cross-linking was stopped by adding Glycine to a final concentration of
411 0.125 M. After five minutes at 37°C, cells were lysed directly in the plates by resuspension in
412 cell lysis buffer for 5 minutes. Then, the samples were pelleted, resuspended in nuclei lysis
413 buffer and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a BioRuptor
414 (Diagenode, Liege, Belgium). After preclearing with a 50% slurry of Protein A-G beads pre-

415 incubated with salmon sperm DNA and BSA for 4 hours at +4°C, the chromatin were
416 incubated with the anti-HIC1 antibodies, normal rabbit IgG or with no antibodies overnight.
417 The antibody-bound chromatin was then pooled down for 30 minutes with Protein A-G
418 beads, washed extensively and eluted two-times by 250 µl of elution buffer. After addition of
419 20 microliters of 5M NaCl, the cross-linking was reversed by overnight incubation at 65°C.
420 The immunoprecipitated DNAs as well as whole cell extract DNAs (input) were purified by
421 treatment with RNase A and then proteinase K followed by purification on Nucleobond
422 Extract II (Macherey-Nagel).
423 For ChIP upon ChIP experiments, we started with eight fold more cells than in the single
424 ChIP. After the first round of immunoprecipitation, the beads were pooled by centrifugation
425 in TE buffer and incubated in 100 microliters of elution buffer for 10min at 65°C. After
426 centrifugation, the supernatant was diluted in 900 microliters of IP buffer and incubated with
427 the second antibody as in a single ChIP experiment.
428 The purified DNAs were used for PCR analyses using relevant primers for *SIRT1*, *E2F1*,
429 *ATOH1*, *Cyclin D1*, *P57Kip2* and *GAPDH*.

430

431

Acknowledgements

432 We thank Dr Rakesh KUMAR for Myc-MTA1 expression vector, Dr Henk
433 STUNNENBERG for MBD2 and MBD3 expression vectors and Dr Pierre-Antoine
434 DEFOSSEZ for gift of antibodies. We are indebted to Drs Stéphane ANSIEAU, Vanessa
435 DEHENNAUT, Bénédicte FOVEAU, Alexis VERGER and Brian R. ROOD for insightful
436 comments and critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from
437 CNRS, the PASTEUR Institute, the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Interrégional
438 du Septentrion), the CNO (Cancéropole Nord-Ouest) and the Association pour la Recherche
439 contre le Cancer (ARC 3983 and ARC 1081). Capucine FLEURIEL was supported by a

440 fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and from the Association
 441 pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

442

443

References

444

- 445 1. **Bereshchenko, O. R., W. Gu, and R. Dalla-Favera.** 2002. Acetylation inactivates
 446 the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet* **32**:606-13.
- 447 2. **Besson, A., S. F. Dowdy, and J. M. Roberts.** 2008. CDK inhibitors: cell cycle
 448 regulators and beyond. *Dev Cell* **14**:159-69.
- 449 3. **Bowen, N. J., N. Fujita, M. Kajita, and P. A. Wade.** 2004. Mi-2/NuRD: multiple
 450 complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* **1677**:52-7.
- 451 4. **Briggs, K. J., I. M. Corcoran-Schwartz, W. Zhang, T. Harcke, W. L. Devereux,
 452 S. B. Baylin, C. G. Eberhart, and D. N. Watkins.** 2008. Cooperation between the
 453 Hic1 and Ptc1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* **22**:770-85.
- 454 5. **Britschgi, C., M. Rizzi, T. J. Grob, M. P. Tschan, B. Hugli, V. A. Reddy, A. C.
 455 Andres, B. E. Torbett, A. Tobler, and M. F. Fey.** 2006. Identification of the p53
 456 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene
 457 hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* **25**:2030-9.
- 458 6. **Chen, W. Y., X. Zeng, M. G. Carter, C. N. Morrell, R. W. Chiu Yen, M. Esteller,
 459 D. N. Watkins, J. G. Herman, J. L. Mankowski, and S. B. Baylin.** 2003.
 460 Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of
 461 malignant tumors. *Nat Genet* **33**:197-202.
- 462 7. **Chen, W., T. K. Cooper, C. A. Zahnow, M. Overholtzer, Z. Zhao, M. Ladanyi, J.
 463 E. Karp, N. Gokgoz, J. S. Wunder, I. L. Andrusis, A. J. Levine, J. L. Mankowski,
 464 and S. B. Baylin.** 2004. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the
 465 role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**:387-98.
- 466 8. **Chen, W. Y., D. H. Wang, R. C. Yen, J. Luo, W. Gu, and S. B. Baylin.** 2005.
 467 Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-
 468 damage responses. *Cell* **123**:437-48.
- 469 9. **Chinnadurai, G.** 2007. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int*
 470 *J Biochem Cell Biol* **39**:1593-607.
- 471 10. **Deltour, S., C. Guerardel, and D. Leprince.** 1999. Recruitment of SMRT/N-CoR-
 472 mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ
 473 transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B. *Proc Natl Acad Sci U*
 474 *S A* **96**:14831-6.
- 475 11. **Deltour, S., S. Pinte, C. Guerardel, B. Wasylyk, and D. Leprince.** 2002. The
 476 human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate
 477 GLDLSKK motif. *Mol Cell Biol* **22**:4890-901.
- 478 12. **Denslow, S. A., and P. A. Wade.** 2007. The human Mi-2/NuRD complex and gene
 479 regulation. *Oncogene* **26**:5433-8.
- 480 13. **Fleuriet, C., M. Touka, G. Boulay, C. Guerardel, B. R. Rood, and D. Leprince.**
 481 2009. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J*
 482 *Biochem Cell Biol* **41**:26-33.
- 483 14. **Fujita, N., D. L. Jaye, C. Geigerman, A. Akyildiz, M. R. Mooney, J. M. Boss, and
 484 P. A. Wade.** 2004. MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B

- 485 lymphocyte differentiation. *Cell* **119**:75-86.
- 486 15. **Guerardel, C., S. Deltour, S. Pinte, D. Monte, A. Begue, A. K. Godwin, and D.**
 487 **Leprince.** 2001. Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1
 488 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol*
 489 *Chem* **276**:3078-89.
- 490 16. **Hay, R. T.** 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**:1-12.
- 491 17. **Kumar, R., R. A. Wang, and R. Bagheri-Yarmand.** 2003. Emerging roles of MTA
 492 family members in human cancers. *Semin Oncol* **30**:30-7.
- 493 18. **Kwon, H. S., and M. Ott.** 2008. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci.*
- 494 19. **Lauberth, S. M., and M. Rauchman.** 2006. A conserved 12-amino acid motif in
 495 Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol*
 496 *Chem* **281**:23922-31.
- 497 20. **Lauberth, S. M., A. C. Bilyeu, B. A. Firulli, K. L. Kroll, and M. Rauchman.** 2007.
 498 A phosphomimetic mutation in the Sall1 repression motif disrupts recruitment of the
 499 nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of Gbx2. *J Biol*
 500 *Chem* **282**:34858-68.
- 501 21. **Le Guezennec, X., M. Vermeulen, A. B. Brinkman, W. A. Hoeijmakers, A.**
 502 **Cohen, E. Lasonder, and H. G. Stunnenberg.** 2006. MBD2/NuRD and
 503 MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional
 504 properties. *Mol Cell Biol* **26**:843-51.
- 505 22. **Liang, J., M. Wan, Y. Zhang, P. Gu, H. Xin, S. Y. Jung, J. Qin, J. Wong, A. J.**
 506 **Cooney, D. Liu, and Z. Songyang.** 2008. Nanog and Oct4 associate with unique
 507 transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **10**:731-9.
- 508 23. **Manavathi, B., and R. Kumar.** 2007. Metastasis tumor antigens, an emerging family
 509 of multifaceted master coregulators. *J Biol Chem* **282**:1529-33.
- 510 24. **McDonel, P., I. Costello, and B. Hendrich.** 2009. Keeping things quiet: roles of
 511 NuRD and Sin3 co-repressor complexes during mammalian development. *Int J*
 512 *Biochem Cell Biol* **41**:108-16.
- 513 25. **Morey, L., C. Brenner, F. Fazi, R. Villa, A. Gutierrez, M. Buschbeck, C. Nervi, S.**
 514 **Minucci, F. Fuks, and L. Di Croce.** 2008. MBD3, a component of the NuRD
 515 complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol Cell*
 516 *Biol* **28**:5912-23.
- 517 26. **Pinte, S., N. Stankovic-Valentin, S. Deltour, B. R. Rood, C. Guerardel, and D.**
 518 **Leprince.** 2004. The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a
 519 sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding
 520 sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem*
 521 **279**:38313-24.
- 522 27. **Roche, A. E., B. J. Bassett, S. A. Samant, W. Hong, G. A. Blobel, and E. C.**
 523 **Svensson.** 2008. The zinc finger and C-terminal domains of MTA proteins are
 524 required for FOG-2-mediated transcriptional repression via the NuRD complex. *J Mol*
 525 *Cell Cardiol* **44**:352-60.
- 526 28. **Sasaki, T., B. Maier, A. Bartke, and H. Scoble.** 2006. Progressive loss of SIRT1
 527 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell* **5**:413-22.
- 528 29. **Shi, Y., J. Sawada, G. Sui, B. Affar el, J. R. Whetstine, F. Lan, H. Ogawa, M. P.**
 529 **Luke, Y. Nakatani, and Y. Shi.** 2003. Coordinated histone modifications mediated
 530 by a CtBP co-repressor complex. *Nature* **422**:735-8.
- 531 30. **Stankovic-Valentin, N., A. Verger, S. Deltour-Balerdi, K. G. Quinlan, M.**
 532 **Crossley, and D. Leprince.** 2006. A L225A substitution in the human tumour
 533 suppressor HIC1 abolishes its interaction with the corepressor CtBP. *Febs J* **273**:2879-
 534 90.

- 535 31. **Stankovic-Valentin, N., S. Deltour, J. Seeler, S. Pinte, G. Vergoten, C. Guerardel,**
536 **A. Dejean, and D. Leprince.** 2007. An acetylation/deacetylation-SUMOylation
537 switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor
538 HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* **27**:2661-75.
- 539 32. **Tachibana, M., Y. Matsumura, M. Fukuda, H. Kimura, and Y. Shinkai.** 2008.
540 G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence
541 transcription. *Embo J* **27**:2681-90.
- 542 33. **Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley.** 2003. Modification with SUMO. A role
543 in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**:137-42.
- 544 34. **Vo, N., C. Fjeld, and R. H. Goodman.** 2001. Acetylation of nuclear hormone
545 receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional
546 corepressor CtBP. *Mol Cell Biol* **21**:6181-8.
- 547 35. **Wales, M. M., M. A. Biel, W. el Deiry, B. D. Nelkin, J. P. Issa, W. K. Cavenee, S.**
548 **J. Kuerbitz, and S. B. Baylin.** 1995. p53 activates expression of HIC-1, a new
549 candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* **1**:570-7.
- 550 36. **Wang, C., L. Chen, X. Hou, Z. Li, N. Kabra, Y. Ma, S. Nemoto, T. Finkel, W. Gu,**
551 **W. D. Cress, and J. Chen.** 2006. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate
552 apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **8**:1025-31.
- 553 37. **Yang, S. H., and A. D. Sharrocks.** 2004. SUMO promotes HDAC-mediated
554 transcriptional repression. *Mol Cell* **13**:611-7.
- 555 38. **Yang, Y., W. Fu, J. Chen, N. Olashaw, X. Zhang, S. V. Nicosia, K. Bhalla, and**
556 **W. Bai.** 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular
557 response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* **9**:1253-62.
- 558 39. **Zhang, B., K. J. Chambers, D. Leprince, D. V. Faller, and S. Wang.** 2009.
559 Requirement for chromatin-remodeling complex in novel tumor suppressor HIC1-
560 mediated transcriptional repression and growth control. *Oncogene* **28**:651-61.
- 561 40. **Zhang, Q., S. Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J. V. Rocheleau, D. W. Piston,**
562 **and R. H. Goodman.** 2007. Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a
563 HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:829-33.

564
565

Figure Legends

566

567 **Figure 1. HIC1 interacts with MTA1 and recruits it to the *SIRT1* promoter *in vivo*.**

568 (A) Schematic drawing of the human HIC1 and MTA1 proteins. The BTB/POZ domain, the
569 central region (CR) containing the evolutionarily conserved CtBP-interaction domain (CID)
570 (11) and the Acetylation/SUMOylation switch motif (ψ K³¹⁴XEP) (31) and the 5 C₂H₂ Zinc
571 fingers are represented. The fragment of HIC1 used as the bait for two-hybrid screening of a
572 human mammary gland cDNA library included the two autonomous repression domains of
573 HIC1 (amino acids 1-422). The BTB/POZ domain and the central region were fused in frame
574 with a C-terminal LexA DNA-binding domain (DBD) to mimic the HIC1 protein. The human

575 MTA1 protein is shown below. The domains conserved within the MTA family are boxed,
576 including the BAH (Bromo-associated homology), the ELM (Egl-27 and MTA1 homology),
577 the SANT (SW13, ADA2, N-CoR and TF1118) domains (23) and the single GATA-like zinc
578 finger domain (amino acids 387-417) interacting with the RbAp46/48 subunits of the NuRD
579 complex (27). Note that the two first Cysteine of the Zinc finger were not present in the
580 isolated prey (lower-case letters underlined).

581 (B) Schematic drawing of the human NuRD complexes. NuRD complexes are composed of
582 core components (HDAC1, HDAC2, RbAp46 and RbAp48 shown in black) shared with the
583 Sin3 complex and of NuRD-specific subunits (MTA1, MTA2, p66 α /Gatad2a, p66 β /Gatad2b,
584 the ATPases Mi2 α/β and MBD3 shown in light blue) (adapted from (23)).

585 (C) *In vitro*, HIC1 interacts with MTA1. HEK 293T cells were transfected with the above
586 indicated combination of expression vectors for FLAG-HIC1 and Myc-MTA1. Each cell
587 lysate was immunoprecipitated with the anti-HIC1 2563 polyclonal antibody (IP HIC1, lanes
588 1-4) and immunoblotted (WB) with polyclonal antibodies against Myc to detect MTA1. The
589 membrane was then stripped and reprobed with anti-FLAG monoclonal antibodies to
590 ascertain the presence of HIC1. 2% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and
591 immunoblotted with the indicated antibodies (Input 2%, lanes 5-8).

592 (D) *In vivo*, endogenous HIC1 interacts with MTA1. WI38 cells were lysed with IPH buffer
593 and 2% of the lysates were kept as Input (lane 3). Equal amounts of lysates were then
594 immunoprecipitated with the rabbit anti-HIC1 antibodies (lane 1: HIC1 (325)) or with normal
595 rabbit immunoglobulins (lane 2: IgG). The immunoprecipitates were analysed by immunoblot
596 with the goat anti-MTA1 polyclonal antibody (top panel). The membrane was then incubated
597 with another (2563) HIC1 polyclonal antibodies as control (bottom panel).

598 (E) A similar experiment was performed with cellular extracts of DAOY, a medulloblastoma
599 cell line expressing HIC1 (26). The immunoprecipitates were analysed by immunoblot with

600 the anti-MBD3 monoclonal antibodies (top panel) and with the HIC1 (2563) polyclonal
601 antibodies. A shorter exposure of the input lane is shown on the right.

602 (F) Co-occupancy of HIC1 and MTA1 on the *SIRT1* promoter. Human WI38 fibroblasts were
603 analyzed by single ChIP with the indicated antibodies. PCR amplifications were performed
604 with primers flanking the functional HiREs identified in the *SIRT1* promoter (8). PCR with
605 the 5' promoter of *GAPDH* was used as an internal non-binding control.

606

607 **Figure 2. The acetylation/SUMOylation switch on HIC1 K314 regulates the interaction**
608 **with MTA1 but has no effect on the recruitment of CtBP2.**

609 (A) HEK293T cells were transiently transfected with the indicated plasmids for 48h. For
610 each HIC1 mutation, the consequences on interaction with CtBP1 and the highly homologous
611 CtBP2 corepressor (L225A mutant) or on potential post-translational modifications
612 (SUMOylation consensus mutants) are shown above each panel. HIC1 was
613 immunoprecipitated by the polyclonal 2563 anti HIC1 antibodies and detected by the
614 monoclonal anti-FLAG antibodies. MTA1 coprecipitation was detected by monoclonal anti
615 Myc antibodies.

616 (B) Another SUMOylation-deficient mutant, E316A, was similarly tested with MTA1.

617 (C, D) A mutant protein, FLAG-HIC1 K314Q, mimicking a constitutively acetylated isoform
618 of HIC1 was tested for interaction with MTA1 (C) or with CtBP2 (D) as described above.

619

620 **Figure 3. Promoter association analyses through sequential ChIP upon ChIP assays.**

621 (A) HIC1, SUMOylated proteins, MTA1, SIRT1 and HDAC4 are found together on the
622 *SIRT1* and *ATOX1* promoters. Chromatin was prepared from late G1 WI38 cells as described
623 in panel b and immunoprecipitated with polyclonal anti-HIC1 antibodies (325) (1st IP HIC1).

624 The bound material was eluted, divided in two or three aliquots and subjected to a second

625 round of immunoprecipitation (2nd IP) with monoclonal anti-MTA1 antibodies, polyclonal
626 anti-SUMO1 antibodies or with normal rabbit IgG (left panel). PCR amplifications of the
627 previously described HiRE in the *SIRT1* promoter (8), in the human *ATOHI* enhancer (4), in
628 the *E2F1* promoter (39) and of the *GAPDH* promoter as negative control were carried as
629 described in Figure 1F.

630 Similar experiments were performed to analyze the co-occupancy of HIC1 and SIRT1
631 (central panel) and of HIC1 and HDAC4 (right panel).

632 (B) Preparation of quiescent G0 and growing late G1 WI38 cell populations. Quiescent WI38
633 cells were obtained by culture in 0% serum (serum starvation) of sub-confluent cultures for
634 72 hours. Then, the cells were cultured for 10 hours in complete medium containing 10%
635 fetal calf serum to obtain growing cells synchronized in late G1. Chromatins were prepared at
636 the indicated points and analyzed by sequential ChIP-reChIP experiments. As controls, total
637 extracts were prepared from each population and analyzed by Western blot for Proliferating
638 Cell Nuclear Antigen (PCNA) to monitor proliferation and for Cyclin D1 as a control for G1
639 phase. HSP60 was used as a loading control.

640 (C) Differential regulation of known (*SIRT1*, *ATOHI* and *E2F1*) and of newly identified
641 (*Cyclin D1* and *P57Kip2*) HIC1 target genes by CtBP and NURD complexes in quiescent
642 versus growing WI38 cells. ChIP-upon ChIP analyses were performed on WI38 cells after 72
643 hours of serum starvation (quiescent cells; left panel) and 10 hours post serum stimulation
644 (late G1; right panel) to analyze the co-occupancy of HIC1 and MTA1 and of HIC1 and
645 CtBP1 on the indicated promoters and on the human *ATOHI* 3' enhancer.

646

647 **Figure 4. Identification of a new, evolutionarily conserved, HIC1 binding site in the**
648 **human, murine and rat *SIRT1* promoters.** *In silico* phylogenetic analyses demonstrate that
649 the two previously described “distal” HIC1 binding sites (8) (black boxes) are not well

650 conserved, especially for the upstream site. By contrast, these analyses identified a new HIC1
651 binding site (dark blue box) that is perfectly conserved in the human, murine and rat genomes
652 in the basal promoter region. Numbering was deduced from the human *SIRT1* mRNA
653 sequence (NM_012238; gi 13775598) and genomic sequence (NT_008583.16; gi 37551286)
654 with the potential transcription start site (+1) indicated as a bent arrow. The ATG initiation
655 codon at position +54 is also indicated. This proximal HIC1 site is adjacent to a conserved
656 E2F1 binding site (underlined in the sequence) (plain oval). A GC dinucleotide in the mouse
657 *SIRT1* promoter whose double point mutation (-67A66T) abolishes E2F1 response is
658 indicated in italics and underlined (note that in this paper, the numbering starts at the ATG
659 codon) (36). An upstream E2F1 binding site which is not conserved in the murine genome is
660 shown as a dotted oval (36).

661

662 **Figure 5. HIC1 recruits the CtBP and NURD complexes to mutually exclusive sites on**
663 **the *SIRT1* promoter in quiescent versus late G1 growing WI38 cells.**

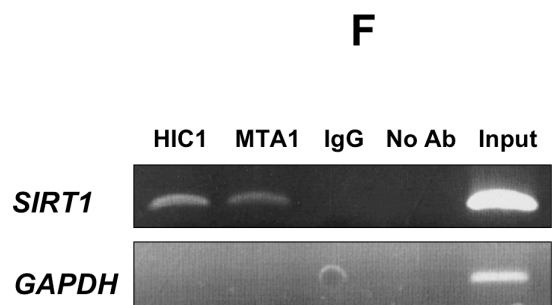
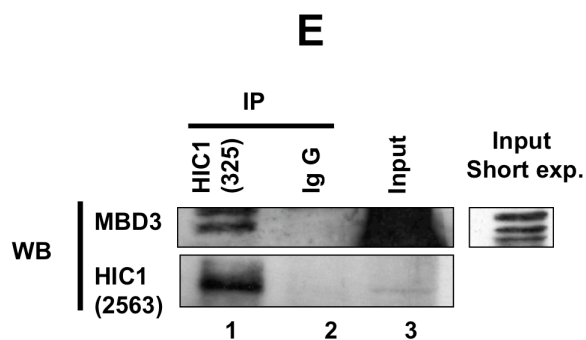
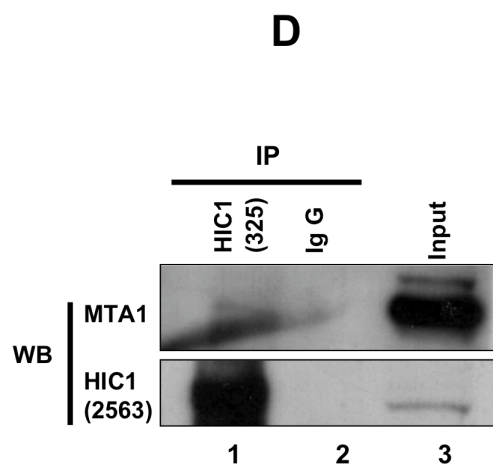
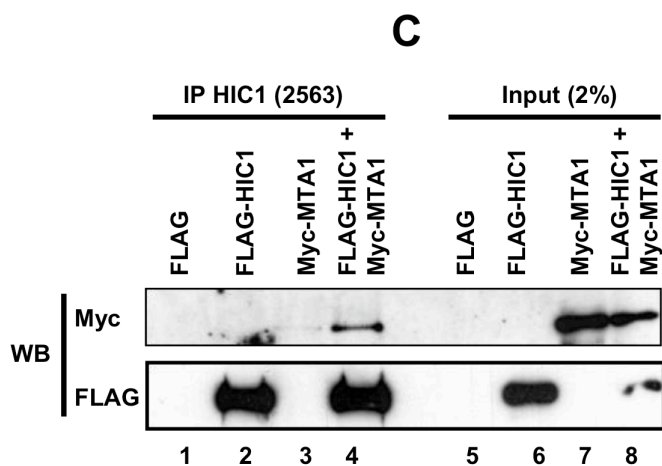
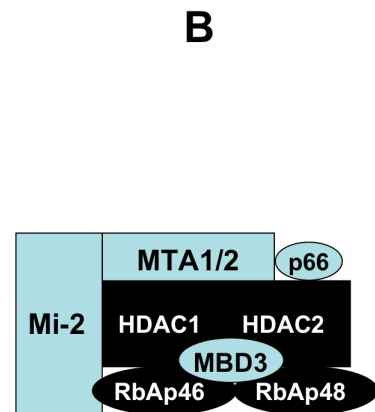
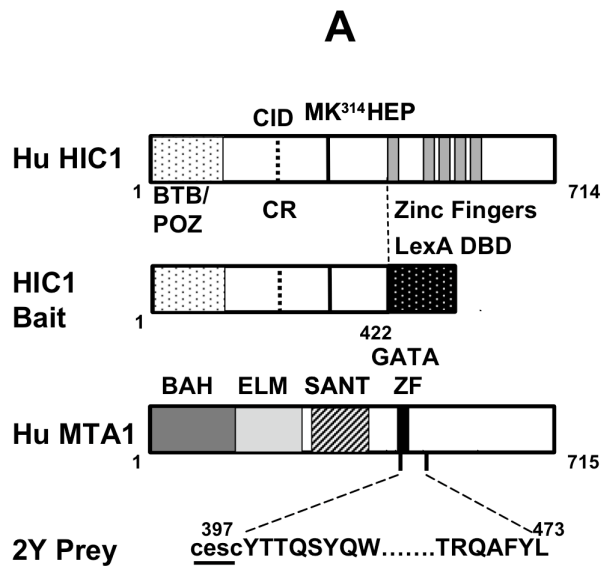
664 (A) Differential binding of the two types of HIC1 complexes on the *SIRT1* distal and
665 proximal promoters. (Left panel) ChIP-upon ChIP analyses were performed on WI38 cells
666 after 72 hours of serum starvation (quiescent cells; top) and 10 hours post serum stimulation
667 (growing cells (late G1); bottom) to analyze the co-occupancy of HIC1 and MTA1 and of
668 HIC1 and CtBP1 on the two types of HIC1 binding sites. Representative gels are shown for
669 PCR with primers amplifying the distal and proximal sites in the *SIRT1* promoter. (Right
670 panel) Schematic representation of the dynamics of complex association on the distal and
671 proximal sites is shown. We have previously shown that HIC1 can interact similarly with
672 both CtBP1 and the highly related CtBP2 corepressors, generally referred collectively as
673 CtBP (30). Our results (Figure 2A) have suggested that the recruitment of the CtBP and
674 NuRD complexes could occur simultaneously.

675 (B) Changes in enrichment of silencing epigenetic marks on the mutually exclusive sites
676 HiRE of the *SIRT1* promoter in quiescent versus late G1 growing WI38 cells. ChIP
677 experiments were performed on chromatin from quiescent or late G1 growing WI38 cells
678 using antibodies directed against various histone marks. Representative gels are shown for
679 PCR with primers amplifying the distal and proximal sites in the *SIRT1* promoter.

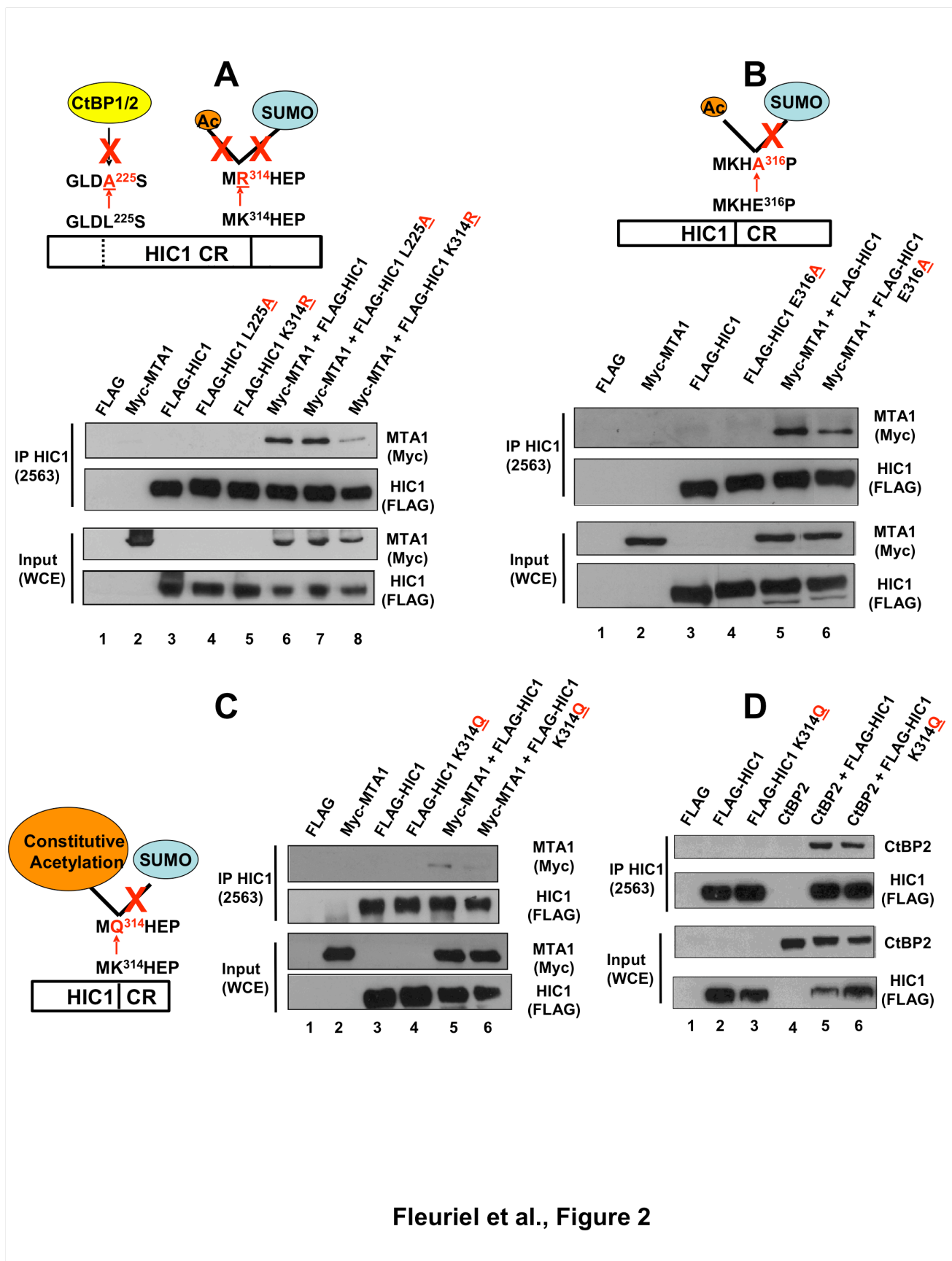
680 (C) Schematic representation of the dynamics of histone epigenetics mark on the distal and
681 proximal sites is shown.

682 (D) Total cell extracts from quiescent or late G1 WI38 cells were analyzed by Western blot
683 for the expression of SIRT1 and HIC1 in two independent experiments. In each case, Hsp60
684 was used as a loading control.

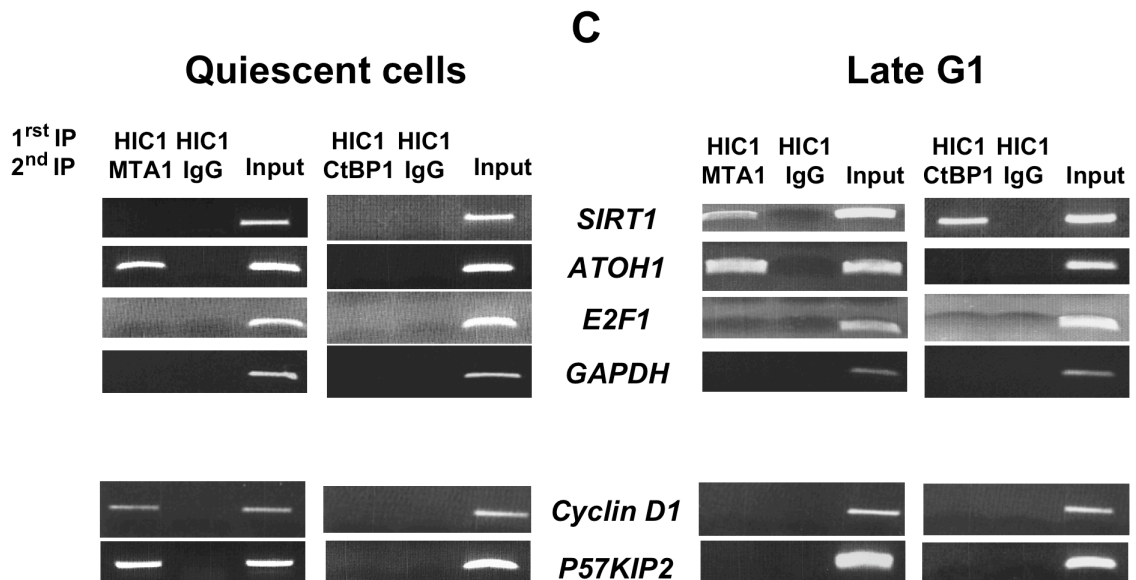
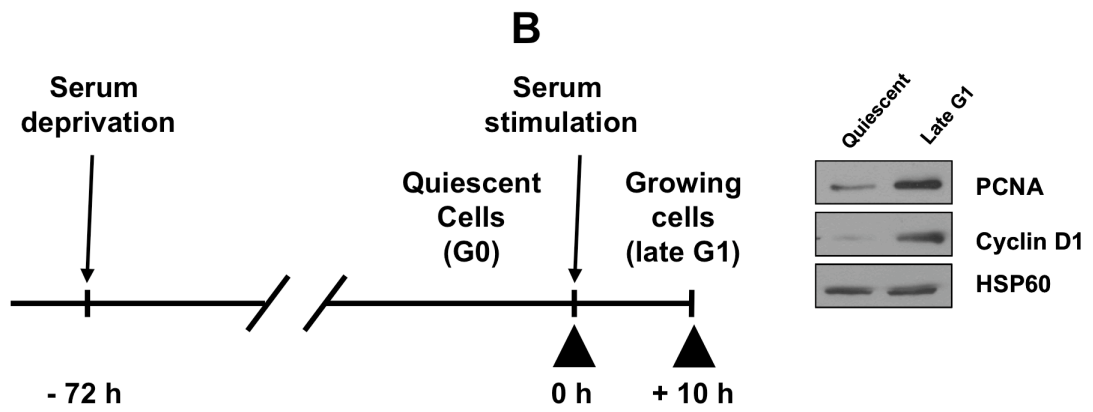
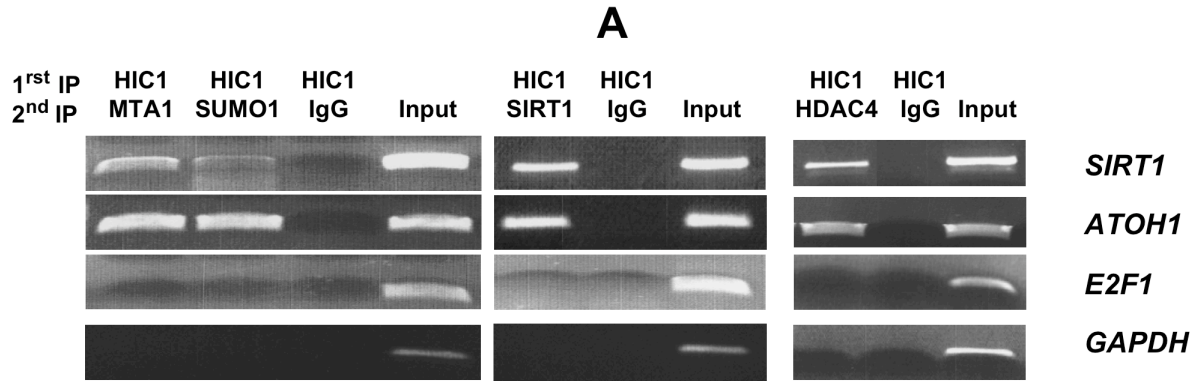
685



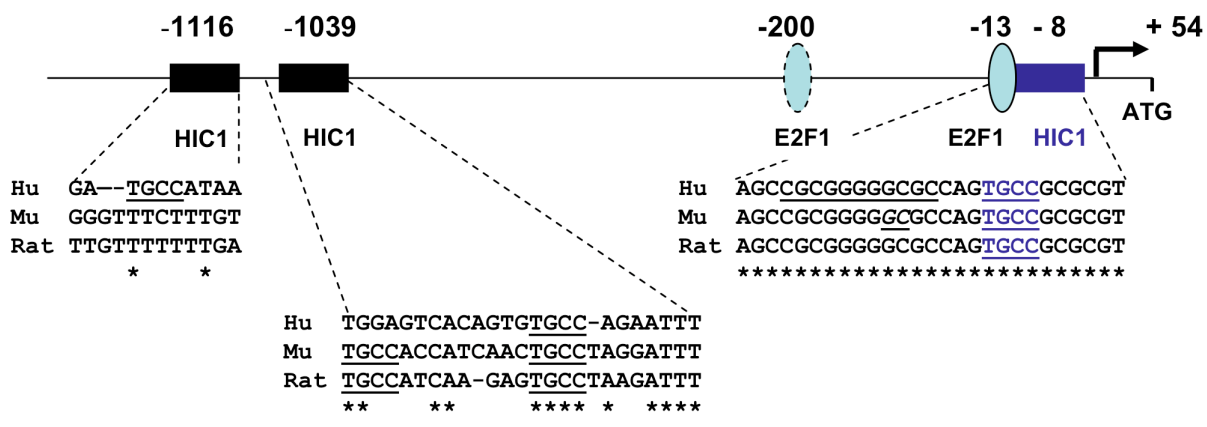
Fleuriel et al., Figure 1



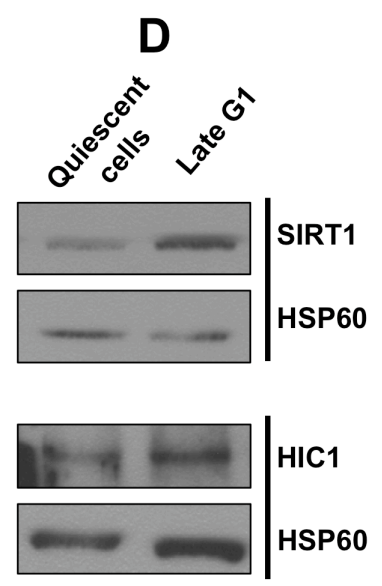
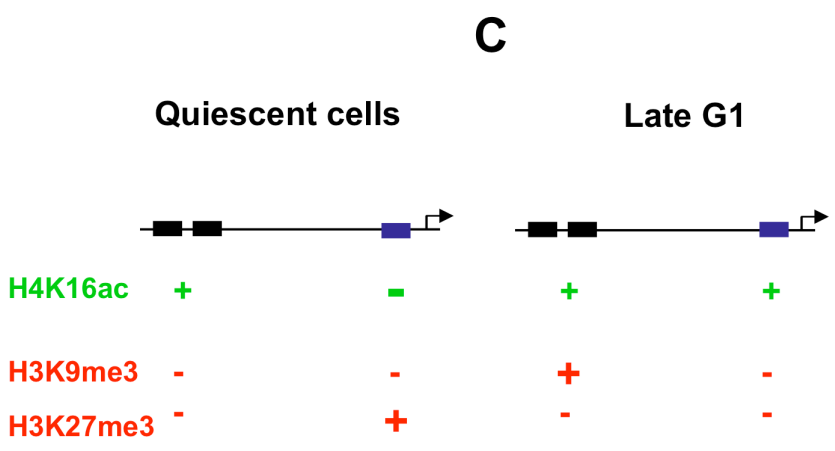
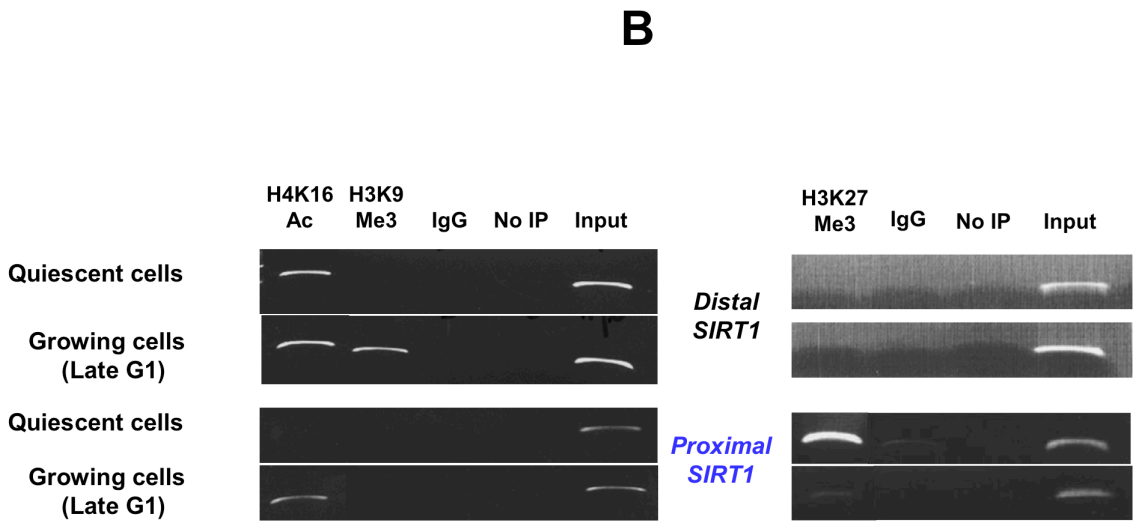
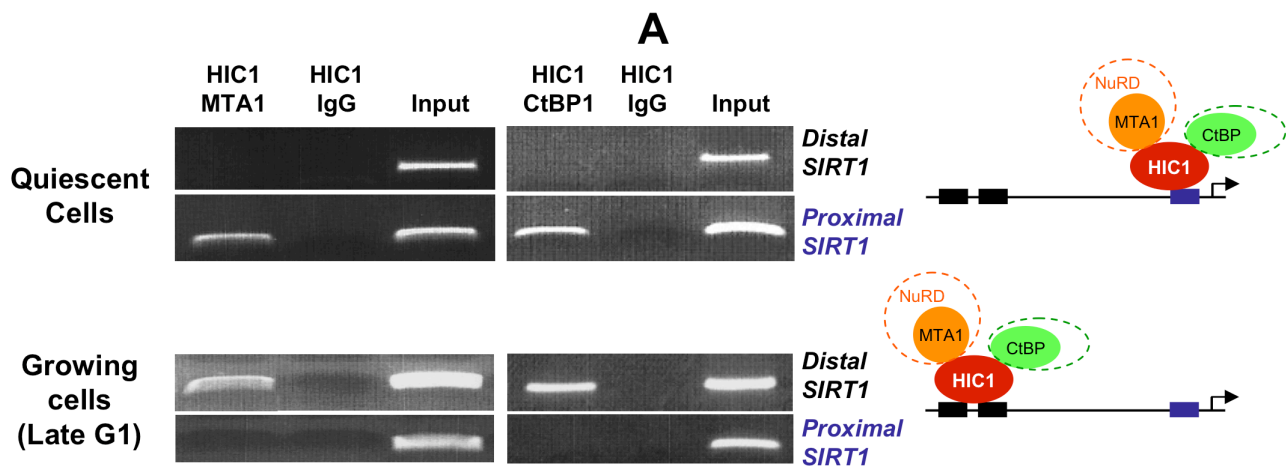
Fleuriel et al., Figure 2



Fleuriel et al., Figure 3



Fleuriel et al., Figure 4



Fleuriel et al., Figure 5

Legends to Supplementary Figures

Supplementary Figure 1. HIC1 interacts with MBD2 and MBD3. (a) *In vitro*, HIC1 interacts with MBD2 and MBD3. HEK 293T cells were transfected with the above indicated combination of expression vectors for HIC1 (pTL-HIC1), MBD2 (pcDNA3-FLAG-MBD2) and MBD3 (pcDNA3-FLAG MBD3). 48 hours after transfection, the cells were lysed in IPH buffer. Each cell lysate was then immunoprecipitated with the anti-FLAG monoclonal antibodies (IP FLAG, lanes 1-6). The immunoprecipitates were then analysed by Western blotting with an anti-HIC1 (2563) polyclonal antibody to detect co-precipitated HIC1. The membrane was then stripped and probed with anti-FLAG antibodies to detect MBD2 and MBD3 in the immunoprecipitates.

(b) 2% of each whole cell extract were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Inputs, lanes 1-6) to ascertain the presence of the correct combinations of plasmids in each transfection.

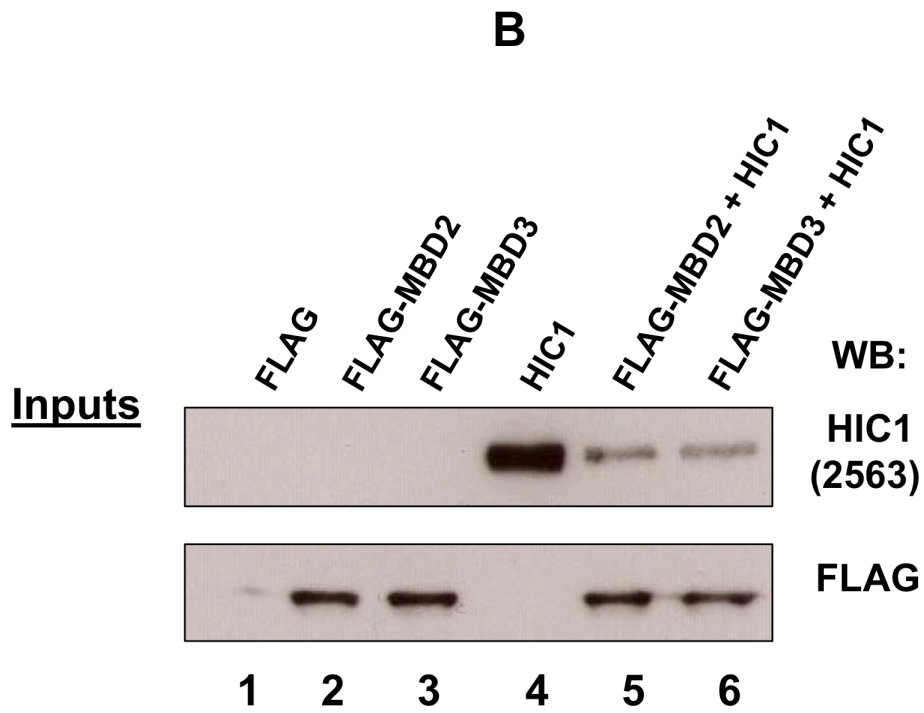
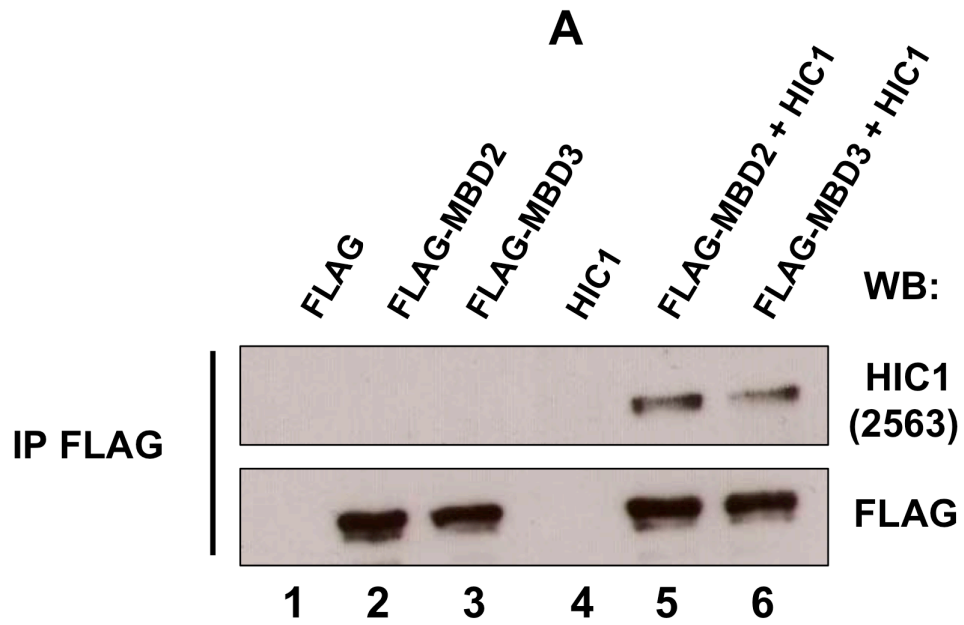
Supplementary Figure 2. The constitutively acetylated HIC1 K314Q mutant and the SUMOylation-deficient mutants (K314R and E316A) are defective in transcriptional repression activity *in vitro*. The structure of the various BTB-RC chimeras is schematically shown on the left. Reporter assays were performed in RK13 cells with the 5xGal4-tk-luc reporter and similar amounts of empty Gal4 DBD or BTB-RC HIC1 chimeras. After normalization to a cotransfected β -galactosidase vector, the repressive activity was expressed to the activity of the Gal4 expression vector which was set to 1, as previously described (31).

Supplementary Figure 3. The human *Cyclin D1* promoter sequence contains a functional HIC1 binding site. *In silico* analyses identified in the *Cyclin D1* promoter a

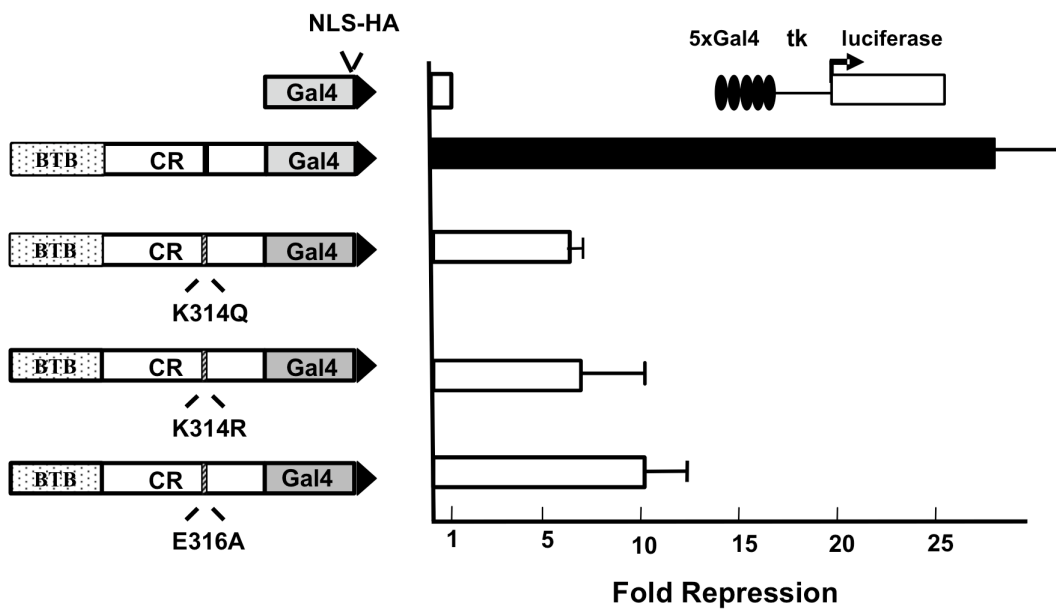
sequence around position -1623, matching the consensus HIC1 binding site. The sequence used as a labelled probe in *in vitro* gel retardation assays is shown with the core GGCA (TGCC) motif underlined and the nucleotides matching the HiRE consensus that we previously defined, indicated in bold (Pinte et al., 2004). Binding of the full-length FLAG-HIC1, Δ POZ and 5-ZF-Cterm proteins expressed in reticulocyte lysates was examined by EMSA using the radiolabelled *Cyclin D1* -1623 site as probe as previously described (26). Unprogrammed reticulocyte lysates (-) was used as control. The low binding observed with the full-length protein is due to the inhibitory effect of the BTB/POZ domain on the binding of HIC1 to a single site *in vitro* as previously described (26).

Supplementary Figure 4. CLUSTAL alignments of the *P57Kip2* promoter regions.

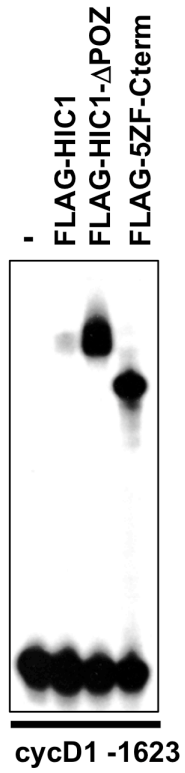
The genomic sequences for the human (D64137.1; gi: 9929452) and *Mus musculus* (AF161190; gi: 6007624) *P57Kip2* genes were extracted from GenBank. These sequences were anchored on the conserved splice donor site (gt) at the 3' end of the first non-coding exons and aligned using CLUSTAL/Jalview (EMBL) and default parameters. In the consensus lane (Cons), identical residues are shown as *, conserved substitutions as : and semi-conserved substitutions as . under the aligned sequences. The output file was subsequently edited manually. Putative HIC1 responsive elements (HiRE) are indicated with the GGCA (or TGCC) core motif highlighted in blue, underlined and in bold (26). The adjacent nucleotides matching the HiRE are indicated in bold. Conserved potential TATA boxes are similarly indicated and highlighted in green. The numbering starts with the first nucleotide indicated for the mRNA sequence (bold and underlined). The oligonucleotides used for PCR in the ChIP-reChIP experiments are shown in yellow.



Fleuriel et al., Supplementary Figure 1



Fleuriel et al., Supplementary Figure 2



HIRE consensus

C C C
 GNGGGGGCAACC

Cyclin D1CTCCCT GCTGGGGCAACC CATCGCTCC.....
 (-1623)

Fleuriel et al., Supplementary Figure 3

Hu P57Kip2	GCGGGGCGGCCG	CCAATCGCCGTGGTGTGT	TGAAACTGAAAATACTACATTA	-118		
Mu P57Kip2	G-GCTGCA-CCTCCAATCGCCGCGGTGTTGTTGAAACTGAAAATACTACATTA			-97		
Cons	* * * *	*****	*****	*****		
Hu P57Kip2	TGCTAATCGCGCCGGGCCCGCGCGCACGGGGTGGGGCCCGCGCG	TATAAA	GGGGGCGC	-58		
Mu P57Kip2	TGCTAATCGTGAGGAGGCCCGCGCGCGGGGGTGGGGCCAGCGCG	TATAAA	GGGG-CGC	-38		
Cons	*****	*	*****	*****		
Hu P57Kip2	AGGCGGGCTGGGCGTTCCACAGGCCAAGTGCCTGTGCTCGAGGGG	TGCC	GGCCAGGCCT	+3		
Mu P57Kip2	AG-CGGGCTGGGCGTTCCACAGGCCAGTGCCTGTGCTCGAGGGG	TGCC	GGCTAGGCC	+22		
Cons	**	*****	*****	*****		
Hu P57Kip2	GA-----GCGAGCGAGCTAGCCAGCA	GGCA	TGCAGGGGGCGCGCG	TGCC	GTCCGGACGA	+57
Mu P57Kip2	GACTGAGAGCAAGCGAACAGGCA	GGCA	AGCTCCGAGGGGGCGCGCC	-CAAGCTGGACAG	+81	
Cons	**	**	*****	*	* * *	
			s.d.			
Hu P57Kip2	GACAGGCGAACC	GACGCAGAAGA-GTCCAC	CACCGGACAGCCAG	gt	+104	
Mu P57Kip2	GACAAGCGATCCAGACGCAGGAGCCGTCCATCACCAATCAGCCAG	gt			+134	
Cons	****	****	*****	*****	*****	

Fleuriel et al., Supplementary Figure 4

Résultats complémentaires préliminaires

Ce même crible double hybride a également permis d'isoler PIAS3, une SUMO E3 ligase dont le mécanisme d'action nécessite l'interaction avec la protéine cible.

L'interaction entre les protéines HIC1 et PIAS3 surexprimées a été confirmée par une expérience de coimmunoprécipitation (CoIP) dans la Thèse de Nicolas Stankovic-Valentin. Dans le but d'étudier la fonctionnalité de cette interaction, un test d'activité E3 ligase a été mis en place. De manière surprenante et contrairement à PIAS1, PIAS3 ne permet pas la SUMOylation de HIC1 (Nicolas Stankovic-Valentin, Thèse de l'Université du Droit et de la Santé Lille II, 27 octobre 2006). Cependant, la forte implication des groupes étudiant les protéines PIAS dans la caractérisation du rôle E3 ligase de celles-ci a occulté certaines autres fonctions de ces protéines. Ainsi, PIAS3 permet par exemple le recrutement de CBP/p300 par Smad3 (Long et al., 2004).

HIC1 étant acétylée par CBP/p300, notamment sur sa Lysine 314 (Stankovic-Valentin et al., 2006), PIAS3 pourrait permettre le recrutement de ces protéines à HIC1 et permettre son acétylation. Etant donné que MTA1 n'interagit pas avec la forme HIC1 acétylée, cette interaction devrait être moins importante en présence de PIAS3. Ceci a pu être vérifié en surexpression transitoire en cellules HEK293T. En effet, une quantité beaucoup plus faible de MTA1 est immunoprécipité par HIC1, et ce lorsque PIAS3 est coexprimée.

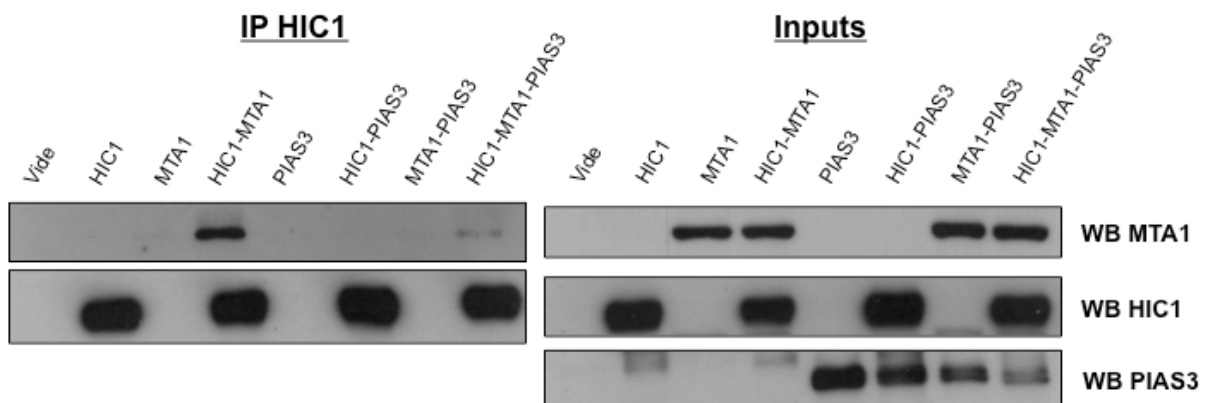


Figure 45 : La présence de PIAS3 diminue fortement l'interaction entre HIC1 et MTA1.

Le mécanisme de désacétylation/SUMOylation de la Lysine 314 de HIC1 ferait donc intervenir un complexe constitué des deux histones désacétylases HDAC4/SIRT1, tandis que le mécanisme d'acétylation de ce même résidu pourrait impliquer un complexe constitué de PIAS3 et CBP.

III. Publication n°2

HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250

Capucine VAN RECHEM, Gaylor BOULAY et Dominique LEPRINCE.

Biochemical and Biophysical Research Communications (2009), 385, 586-590.

Notre équipe a collaboré à une publication récente effectuée par l'équipe de Sheng Wang (Boston), concernant l'étude du recrutement par HIC1 des complexes SWI/SNF via BRG1, sur le promoteur de *E2F1*, en fonction de l'état de croissance des cellules (Zhang et al., 2009). Cet article démontre l'implication de HIC1 dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment par répression du gène *E2F1* par recrutement des complexes SWI/SNF, et ce spécifiquement pendant la phase G0, c'est-à-dire lorsque les protéines de la famille E2F ne sont pas exprimées.

Dans cette seconde publication à propos de ce sujet, nous identifions un sous-type de complexe SWI/SNF recruté par HIC1. Il s'agit de ceux composés de la sous-unité ARID1A, généralement décrite comme appartenant aux complexes SWI/SNF responsables d'une activité de répression transcriptionnelle. Nous montrons également que, comme le laissait supposer l'article de Zhang et al., HIC1 recrutant BRG1, elle n'interagit pas avec la seconde ATPase mutuellement exclusive de ces complexes, BRM.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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

HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A

Capucine Van Rechem, Gaylor Boulay, Dominique Leprince *

CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de LILLE, Université de Lille Nord de FRANCE, Institut PASTEUR de LILLE, IFR 142, 1 Rue Calmette, 59017 LILLE Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2009

Available online 30 May 2009

Keywords:

HIC1

ARID1A

BAF250A

BRG1

SWI/SNF complexes

Transcriptional repression

17p13.3

Tumor suppressor genes

BTB/POZ

ABSTRACT

HIC1, a tumor suppressor gene epigenetically silenced in many human cancers encodes a transcriptional repressor involved in regulatory loops modulating p53-dependent and E2F1-dependent cell survival and stress responses. *HIC1* is also implicated in growth control since it recruits BRG1, one of the two alternative ATPases (BRM or BRG1) of SWI/SNF chromatin-remodeling complexes to repress transcription of *E2F1* in quiescent fibroblasts. Here, through yeast two-hybrid screening, we identify ARID1A/BAF250A, as a new *HIC1* partner. ARID1A/BAF250A is one of the two mutually exclusive ARID1-containing subunits of SWI/SNF complexes which define subsets of complexes endowed with anti-proliferative properties. Co-immunoprecipitation assays in WI38 fibroblasts and in BRG1^{-/-} SW13 cells showed that endogenous *HIC1* and ARID1A proteins interact in a BRG1-dependent manner. Furthermore, we demonstrate that *HIC1* does not interact with BRM. Finally, sequential chromatin immunoprecipitation (ChIP-reChIP) experiments demonstrated that *HIC1* represses *E2F1* through the recruitment of anti-proliferative SWI/SNF complexes containing ARID1A.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

SWI/SNF-type complexes are evolutionarily conserved multi-subunit chromatin-remodeling complexes which use the energy of ATP hydrolysis to mobilize nucleosomes and remodel chromatin [1]. They play a crucial role in proper differentiation, development and tumor suppression [1]. The term SWI/SNF complex refers actually to a heterogenous small series of related complexes of variable composition associating either of the two related but distinct core ATPases BRG1 and BRM to seven to ten non-catalytic subunits [1–7]. These non-catalytic subunits referred to as BRM- or BRG1-associated factors or BAFs contain various DNA-binding and protein-binding motifs which modulate the targeting and activity of the ATPase [1]. One of these stably associated non-catalytic BAF components is a member of the ARID (A-T rich interaction domain) family of DNA-binding proteins. Similar to the BRG1 and BRM ATPases, two ARID-containing proteins the ARID1A/BAF250A and its paralog ARID1B/BAF250B are also alternative, mutually exclusive subunits of the complexes but can associate with both ATPases [3–5].

Distinct subsets of SWI/SNF complexes endowed with anti-proliferative properties and containing ARID1A or endowed with pro-proliferative properties and containing ARID1B have been characterized through siRNA-knockdowns of each specific ARID1 subunit [5]. Similarly, antagonistic roles have been demonstrated for SWI/

SNF complexes containing either of two related ATPases BRM and BRG1 in a model of osteoblast differentiation [6]. Together, these results have revealed an unanticipated degree of specialization of function for SWI/SNF complexes [1,5].

BRG1 has been implicated in the activation and repression of multiple genes involved in cell cycle control and growth regulation through the modulation of chromatin structure in various tissues and physiological conditions [7]. Recently, we have shown that BRG1 is required for the transcriptional repression of *E2F1* in quiescent fibroblasts through its interaction with the transcriptional repressor *HIC1* [8]. This *HIC1*-mediated repression is strictly dependent of BRG1 and required for the serum deprivation-induced growth arrest [8].

HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) is a tumor suppressor gene located at 17p13.3, a region frequently deleted and epigenetically silenced in human cancers [9,10]. *HIC1* encodes a sequence-specific transcriptional repressor with five C₂H₂ zinc fingers mediating DNA binding to a consensus binding site (HiRE) consisting of a 5'-C₂/C₁NGC₂/C₁GGGCA₂/ACC-3' sequence centered on a GGCA motif [11]. It also contains a central region that recruits CtBP co-repressor complexes [12] as well as a N-terminal BTB/POZ domain capable of autonomous transcriptional repression [13]. *HIC1* is a direct target gene of P53 transactivation through a P53-responsive element [9,14,15]. In fact, a regulatory feed-back loop between *HIC1* and P53 has been deciphered in which *HIC1* directly represses transcription of *SIRT1* in response to nutrient deprivation [16] or to modulate P53-dependent DNA-damage responses [17]. Indeed, *SIRT1* is a NAD⁺-dependent Class III HDAC which deacetylates

* Corresponding author. Fax: +33 3 20 87 1111.

E-mail address: dominique.leprince@ibl.fr (D. Leprince).

and thereby inactivates P53 [17]. Recently, we have shown that SIRT1 also deacetylates HIC1. However, in striking contrast with P53, this deacetylation strengthens the transcriptional repression potential of HIC1 [18].

HIC1, SIRT1, and E2F1 are also implicated in a regulatory feedback loop since HIC1 represses the *E2F1* promoter [8] and E2F1 activates *HIC1* [22]. Furthermore, E2F1 is a crucial activator of *SIRT1* transcription in response to DNA-damage but SIRT1 binds E2F1 and deacetylates it thus inhibiting E2F1-mediated gene activation [19,20].

Herein, we identified, by yeast two-hybrid screening, ARID1A/BAF250A as a novel partner of HIC1. This interaction occurs between the two HIC1 repression domains and the central 1355–1451 residues of ARID1A, located downstream of the ARID domain. By co-immunoprecipitation analyses, we show that endogenous HIC1 and ARID1A proteins interact in human fibroblasts WI38 but not in the BRG1^{-/-} human adrenal carcinoma cell line, SW13. Consistent with these results, we demonstrate that HIC1 does not interact with BRM, the alternative ATPase of SWI/SNF complexes. Finally, by sequential chromatin immunoprecipitation (ChIP-reChIP), we demonstrate that in serum-starved WI38 cells HIC1 and ARID1A co-occupy the *E2F1* promoter and *ATOH1*, another HIC1 target gene but not the *SIRT1* promoter. Thus, HIC1 is involved in the repression of some target genes in part through the recruitment of the anti-proliferative SWI/SNF complexes defined by the presence of the specific subunits, BRG1 and ARID1A.

Materials and methods

Yeast two-hybrid screen. Bait cloning and Y2H screening were performed by Hybrigenics, S.A., Paris, France. For bait cloning, the BTB-central region of HIC1 (1–422) was PCR-amplified and cloned in frame with a C-terminal LexA DNA-binding domain. The bait construct was checked by sequencing the entire insert, and was subsequently transformed in the L40ΔGAL4 yeast strain. A human breast tissue random-primed cDNA library, transformed into the Y187 yeast strain and containing ten million independent fragments, was used for mating. The screen was performed in conditions ensuring a minimum of 50 million interactions tested, in order to cover five times the primary complexity of the yeast-transformed cDNA library. Seventy-nine millions of interactions were actually tested with HIC1. After selection on medium lacking leucine, tryptophane, and histidine, positive clones were picked, and the corresponding prey fragments were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions.

Constructs. The pcDNA3-FLAG-HIC1 expression vector has been previously described [12]. The HA-tagged hBRM cDNA cloned in the CMV expression vector pCGT has been obtained through the courtesy of Dr. Christian MUCHARDT (Pasteur Institute, Paris).

Cell culture, transfection, and co-immunoprecipitation analyses. HEK 293T and BRG1^{-/-} SW13 cells were maintained in Dulbecco medium supplemented with 10% fetal calf serum. WI38 were purchased from ATCC (14 passages) and cultured in MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, non-essential amino acids, and sodium pyruvate. HEK293T were transfected for 6 h in Opti-MEM (Gibco) by the PEI (Euromedex) method in 100 mm diameter dishes with 2.5 μg of DNA and then were incubated in fresh complete medium, as previously described [18]. Forty-eight hours after transfection, cells were rinsed two times in cold PBS and lysed in cold IPH buffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail (Roche)).

For co-immunoprecipitation experiments, cell lysates were cleared by centrifugation (14,000 rpm, 30 min). The supernatants were incubated overnight with 4 μl of antibody. Then, protein A-G Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added for

30 min. The beads were washed three times with IPH buffer. Proteins were eluted by boiling in Laemmli loading buffer and separated by SDS/PAGE before Western blotting.

Western blot and antibodies. Western blots were performed with the anti-HIC1 2563 and anti-HIC1 325 polyclonal antibodies as previously described [12]. Anti-FLAG M2 is a monoclonal antibody (F3165; Sigma). The mouse monoclonal anti-BAF250A/ARID1A antibodies (sc-32761X) and rabbit polyclonal anti-BRG1 antibodies (BRG1 H-88, sc10768) were purchased from Santa Cruz. The mouse monoclonal anti-HA antibodies (MMS 101-P) and anti-CtBP2 (612044) were obtained from Babco and BD Biosciences, respectively. The secondary antibodies were horseradish peroxidase-linked antibodies raised against rabbit or mouse immunoglobulins (Amersham).

Sequential chromatin immunoprecipitation (ChIP-reChIP). For ChIP-reChIP experiments, we used eight non-confluent WI38 100 mm dishes per second ChIP. The cells were maintained in MEM without serum for 72 h. The first round of chromatin immunoprecipitation ChIP was performed according to published protocols with slight modifications. Briefly, formaldehyde was added directly to the cultured cells to a final concentration of 1% for 10 min at 37 °C. The cross-linking was stopped by adding glycine to a final concentration of 0.125 M. After 5 min at 37 °C, cells were lysed directly in the plates by resuspension in cell lysis buffer for 5 min. Then, the samples were pelleted, resuspended in nuclei lysis buffer and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a BioRuptor (Diagenode, Liege, Belgium). After preclearing with a 50% slurry of protein A-G beads pre-incubated with salmon sperm DNA and BSA for 4 h at +4 °C, the chromatin was incubated with the anti-HIC1 antibodies, normal rabbit IgG or with no antibodies overnight. The antibody-bound chromatin was then pooled down for 30 min with protein A-G beads and washed extensively. After this first round of immunoprecipitation, the beads were pooled by centrifugation in TE buffer and incubated in 100 μl of elution buffer for 10 min at 65 °C. After centrifugation, the supernatant was diluted in 900 μl of IP buffer and incubated with the second antibody and was proceeded as described above. The chromatin bound after this second antibody round was pooled with protein A-G beads and washed extensively as described above. Then, it was eluted two times by 250 μl of elution buffer. After addition of 20 μl of 5 M NaCl, the cross-linking was reversed by overnight incubation at 65 °C. The immunoprecipitated DNAs as well as whole cell extract DNAs (input) were purified by treatment with RNase A and then proteinase K followed by purification on Nucleobond Extract II (Macherey-Nagel).

The purified DNAs were used for PCR analyses using relevant primers for *E2F1*, *ATOH1*, *SIRT1*, and *GAPDH*.

Results and discussion

To further characterize the repression mechanisms brought about by HIC1 on its target genes, we conducted a yeast two-hybrid screen using the two autonomous repression domains of HIC1, the BTB/POZ domain and the central region, as bait to screen a human mammary gland library (Fig. 1A). Seventy-nine millions of interactions were actually tested with HIC1 and after growth on selection medium, positive clones were obtained. One clone and three clones contained the complete coding sequences of human CtBP1 and CtBP2, respectively, in close agreement with our previous work [12].

Three clones corresponded to nucleotides 4437–4807 of the ARID1A/BAF250A mRNA (NM_006015) whereas two other clones corresponded to nucleotides 4418–4726 thus defining a 289 nucleotides contig. The ARID1A/BAF250A protein is a huge 2285 aa protein defining a specific subset of SWI/SNF chromatin remod-

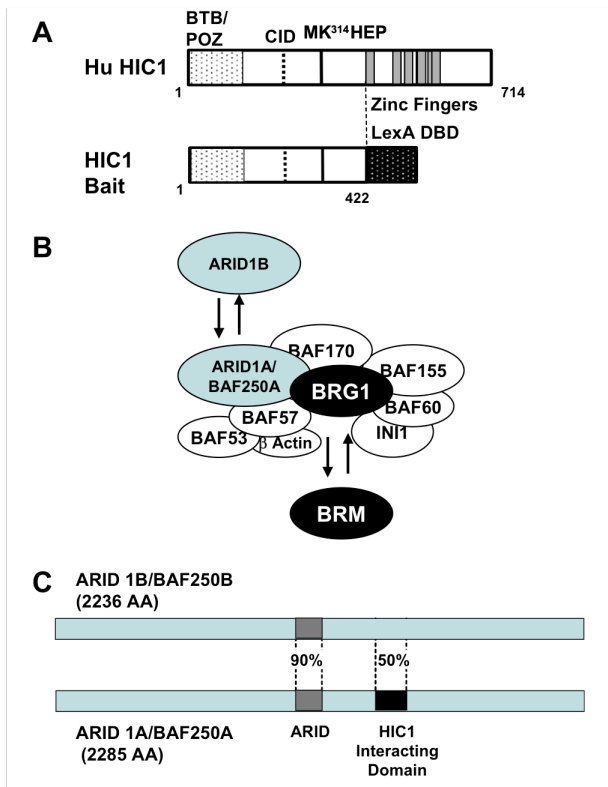


Fig. 1. Schematic drawing of the human HIC1 and ARID1 proteins as well as of SWI/SNF complexes. (A) The BTB/POZ domain, the CtBP-interaction domain (CID) [12] the acetylation/SUMOylation switch motif (ψ K³¹⁴xEP) [18] and the 5 C₂H₂ zinc fingers are schematically represented. The HIC1 bait used for two-hybrid screening included the BTB/POZ domain and the central region (amino acids 1–422) fused in frame with a C-terminal LexA DNA-binding domain (DBD) to mimic the structure of the HIC1 protein. (B) The human SWI/SNF complexes contain a core ATPase either BRG1 or hBRM and a mutually exclusive ARID family subunit, ARID1A/BAF250A or ARID1B/BAF250B. Thus, related SWI/SNF complexes are found, depending on the presence of one of the two ATPases or ARID1 subunits [1,5,6]. This scheme is adapted from reference [5]. (C) The ARID1A/BAF250A and the ARID1B/BAF250B proteins are schematically drawn with the ARID DNA-binding domain and the HIC1 interacting domain highlighted. Degrees of conservation obtained with the BLAST program are indicated.

eling complexes (Fig. 1B) [2]. The HIC1 interacting domain (HID) corresponded to residues 1355–1451 of ARID1A and is located downstream of the ARID DNA-binding domain encoded by residues 1017–1108 (NP_059989.1) (Fig. 1C and Supplementary Fig. 1).

The ARID1B/BAF250B paralog is highly similar in size and exon structure but the two proteins are not well conserved (Fig. 1C). In fact, through CLUSTAL and BLAST analyses, the two proteins ARID1A and ARID1B share a global 65% homology, except for the first 600 N-terminal residues which are highly divergent. This homology reaches 90% in the ARID DNA-binding domain whereas the HIC1 interacting domain is not well-conserved (ca. 50%) (Supplementary Fig. 1).

To confirm the result of our yeast two-hybrid screen, we performed co-immunoprecipitation assays to determine if the two endogenous proteins can interact in mammalian cells. As shown in Fig. 2A, endogenous ARID1A was co-precipitated by the anti-HIC1 antibodies but not by normal rabbit immunoglobulins, demonstrating that HIC1 and ARID1A interact in human WI38 fibroblasts. HIC1 interacts directly with BRG1, as shown by GST pull-down experiments [8]. In addition, the ARID1A subtype of SWI/

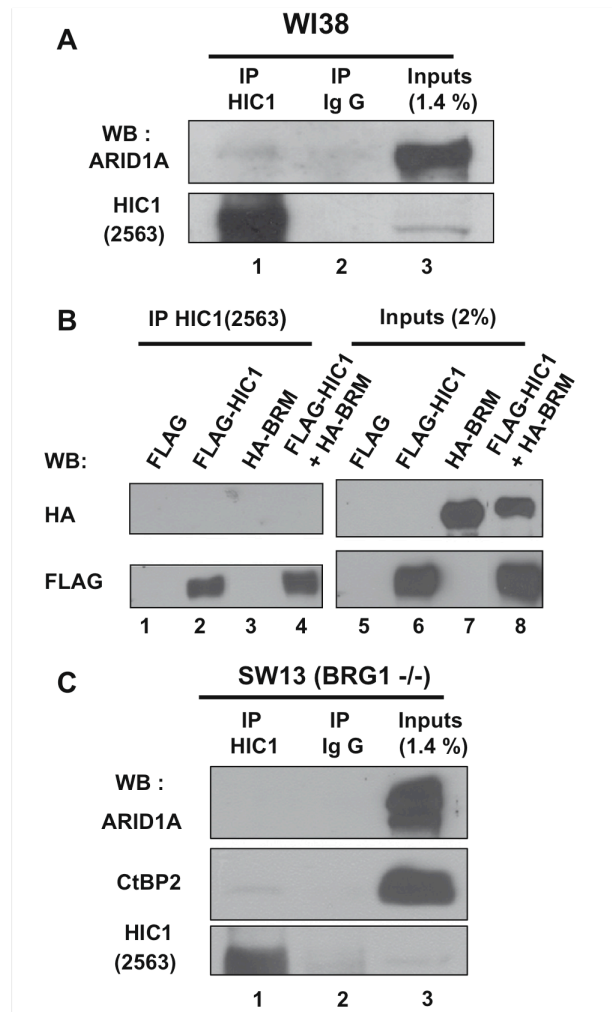


Fig. 2. HIC1 cannot interact with BRM and interacts with ARID1A in a BRG1-dependent manner. (A) *In vivo*, endogenous HIC1 and ARID1A interact in human fibroblasts. WI38 cells were lysed with IPH buffer and 1.4% of the lysates were kept as input (lane 3). Equal amounts of lysates were then immunoprecipitated with the rabbit anti-HIC1 antibodies (lane 1: HIC1 (325)) or with normal rabbit immunoglobulins (lane 2: IgG). The immunoprecipitates were analyzed by SDS/PAGE on 6% acrylamide gels followed by immunoblot with the monoclonal anti-BAF250/ARID1A antibody and polyclonal anti-HIC1 antibody (2563). (B) *In vitro*, HIC1 does not interact with BRM. HEK 293T cells were transfected with the empty pcDNA3FLAG vector or the above indicated combination of expression vectors for FLAG-HIC1 and HA-BRM. 2% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (input, lanes 5–8). Each cell lysate was immunoprecipitated with the anti-HIC1 2563 polyclonal antibody (IP HIC1 (2563); lanes 1–4). The immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting. The membrane was cut and the relevant pieces were incubated with an anti-HA monoclonal antibody to detect BRM (ca. 180 kDa) or with the anti-FLAG monoclonal antibody to ascertain the presence of HIC1 (ca. 83 kDa) in the immunoprecipitates. (C) *In vivo*, endogenous HIC1 and ARID1A do not interact in the BRG1^{-/-} human adrenal carcinoma cell line, SW13. SW13 cells were lysed with IPH buffer and 1.4% of the lysates were kept as input (lane 3). Two batches of lysates corresponding, respectively, to 10% and 90% of the starting material were prepared. In each case, equal amounts of lysates were immunoprecipitated with the rabbit anti-HIC1 antibodies (lane 1: HIC1 (325)) or with normal rabbit immunoglobulins (lane 2: IgG). The resulting immunoprecipitates from the larger batch were analyzed by SDS/PAGE on a 6% acrylamide gel followed by immunoblot with the anti-ARID1A/BAF250A monoclonal antibody to detect ARID1A (250 kDa). In parallel, a similar experiment was performed with the smaller batch on a 8% acrylamide gel followed by immunoblot with the anti-CtBP2 monoclonal antibody to detect CtBP2 (48 kDa).

SNF complexes contains either of the two closely related ATPases, BRG1 and BRM [6]. Thus, these data raised the question of whether HIC1 was also able to interact with BRM. We thus performed co-immunoprecipitation assays in transiently transfected HEK293T cells. FLAG-HIC1 was efficiently precipitated (Fig. 2B, bottom panel, lanes 2 and 4) but was unable to co-immunoprecipitate HA-BRM (Fig. 2B, top panel, lane 4), thus demonstrating that HIC1 cannot associate with BRM.

Consistent with these results, when we performed a co-immunoprecipitation assay for endogenous proteins in the human adrenal carcinoma cell line SW13 which is deficient for BRG1, we failed to detect an interaction between HIC1 and ARID1A (Fig. 2C). Nevertheless, we were able to detect in the same experiment an interaction between endogenous HIC1 and its cognate co-repressor, CtBP2, as an internal positive control of our co-immunoprecipitation experiments (Fig. 2C) [12,16].

Because ARID1A is part of a chromatin remodeling and repression complex and since HIC1 is a sequence-specific transcriptional repressor, we next performed sequential chromatin immunoprecipitation assays (ChIP-reChIP) assays to determine if these two proteins are found colocalized on endogenous HIC1 target genes. To that end, we prepared a quiescent cell population of WI38 fibroblasts by serum starvation (72 h) since HIC1 and BRG1 have been shown to co-occupy the *E2F1* promoter in this G0 cell population [8]. In brief, WI38 chromatin was subjected to a first round of immunoprecipitation with anti-HIC1 polyclonal antibodies. Then, the bound material was eluted and equal amounts were subjected to a second round of immunoprecipitation with anti-ARID1A polyclonal antibodies or rabbit IgG. In these quiescent cells, co-localized HIC1 and ARID1A signals were detected on the relevant regions of the *E2F1* promoter [8], as well as on the *ATOH1* human enhancer recently identified as a new HIC1 target gene [21] but not in the HIC1/IgG ChIP-reChIP (Fig. 3). Interestingly, no specific binding is observed on the *SIRT1* promoter, a *bona fide* HIC1 target gene which is directly repressed by HIC1/SIRT1 or HIC1/CtBP complexes in asynchronously growing WI38 fibroblasts [16,17]. Primers designed to amplify the 5' region upstream of the *GAPDH* promoter did not yield a product, further demonstrating the specificity of our assay.

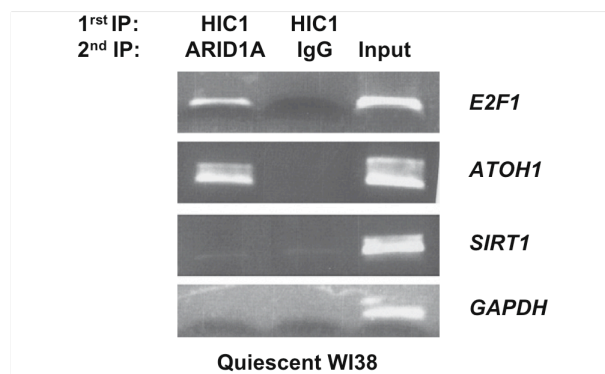


Fig. 3. HIC1 and ARID1A form a stable complex on various HIC1 target genes. Normal human WI38 fibroblasts that express endogenous HIC1 proteins were serum-depleted for 72 h before ChIP-reChIP assay [8]. Briefly, cells were crosslinked with 1% formaldehyde. Crosslinked chromatin was sonicated and immunoprecipitated with polyclonal anti-HIC1 antibody (325) (1st IP HIC1). The bound material was eluted, divided in two and subjected to a second round of immunoprecipitation with monoclonal anti-ARID1A antibodies (2nd IP ARID1A) or with normal rabbit IgG (2nd IP IgG). PCR amplifications were performed using primers flanking the functional HiREs previously identified in the three known HIC1 target genes: *E2F1* [8], *ATOH1* [21], and *SIRT1* [17]. PCR with the 5' promoter of *GAPDH* was used as an internal non-binding control [17]. An H_2O control corresponding to PCR without DNA yielded no amplified products (data not shown).

Thus, these results demonstrate co-occupancy of HIC1 and ARID1A at some HIC1 target genes in quiescent cells, where they might form a stable complex.

In conclusion, our results demonstrate that HIC1 associates with the alternative subunit of the SWI/SNF complexes, ARID1A. This interaction discovered through a yeast two-hybrid screen and confirmed by co-immunoprecipitation assays in human WI38 fibroblasts appears dependent of the presence of BRG1. BRG1 interacts with ARID1A through its N-terminal HSA domain which is conserved in BRM [7]. Since HIC1 associate only with BRG1 [8] but not with BRM (Fig. 2B), it would be interesting to define the HIC1 interacting domain in BRG1. In fact, these two mutually exclusive ATPases of the SWI/SNF complexes share a high degree of sequence identity and display similar biochemical activity *in vitro* but play different roles *in vivo*. BRG1 is essential during development since *Brg1*^{-/-} mice die at the pre-implantation stage. By contrast, *Brm*-null mice are viable and fertile indicating that BRM plays a similar but auxiliary role to BRG1 in most tissues [6].

HIC1 is a multifaceted transcription factor which can recruit different co-repressor complexes to different target genes to fulfill its various biological functions. Only three HIC1 target genes are known so far: *E2F1*, *SIRT1*, and *ATOH1*. As for its role in growth control, our study uncovers new mechanistic insights of the HIC1-mediated repression of *E2F1* which thus relies on a specific subset of SWI/SNF complexes endowed with anti-proliferative properties and containing the core ATPase BRG1 and the specific non-catalytic subunit, ARID1A/BAF250A.

Acknowledgments

We thank Dr. Christian MUCHARDT for the HA-BRM expression vector and the BRG1^{-/-} SW13 cells. We are indebted to Dr. Sébastien PINTE for critical reading of the manuscript. This work was supported by funds from CNRS, the PASTEUR Institute and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). Capucine Fleuriel was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur Technologie and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.115.

References

- [1] D. Reisman, S. Glaros, E.A. Thompson, The SWI/SNF complex and cancer, *Oncogene* 28 (2009) 1653–1668.
- [2] X. Wang, N.G. Nagl, D. Wilsker, M. Van Scoy, S. Pacchione, P. Yaciuk, P.B. Dallas, E. Moran, Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes, *Biochem. J.* 383 (2004) 319–325.
- [3] N.G. Nagl Jr., D.R. Zweitzig, B. Thimmapaya, G.R. Beck Jr., E. Moran, The *c-myc* gene is a direct target of mammalian SWI/SNF-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest, *Cancer Res.* 66 (2006) 1289–1293.
- [4] H. Inoue, T. Furukawa, S. Giannakopoulos, S. Zhou, D.S. King, N. Tanese, Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 41674–41685.
- [5] N.G. Nagl Jr., X. Wang, A. Patsialou, M. Van Scoy, E. Moran, Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control, *EMBO J.* 26 (2007) 752–763.
- [6] S. Flowers, N.G. Nagl Jr., G.R. Beck Jr., E. Moran, Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation, *J. Biol. Chem.* (2009).
- [7] K.W. Trotter, T.K. Archer, The BRG1 transcriptional coregulator, *Nucl. Recept. Signal* 6 (2008) e004.
- [8] B. Zhang, K.J. Chambers, D. Leprince, D.V. Faller, S. Wang, Requirement for chromatin-remodeling complex in novel tumor suppressor HIC1-mediated transcriptional repression and growth control, *Oncogene* 28 (2009) 651–661.
- [9] M.M. Wales, M.A. Biel, W. el Deiry, B.D. Nelkin, J.P. Issa, W.K. Cavenee, S.J. Kuerbitz, S.B. Baylin, p53 activates expression of HIC-1 a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3, *Nat. Med.* 1 (1995) 570–577.

- [10] C. Fleuriel, M. Touka, G. Boulay, C. Guerardel, B.R. Rood, D. Leprince, HIC1 (hypermethylated in cancer 1) epigenetic silencing in tumors, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 26–33.
- [11] S. Pinte, N. Stankovic-Valentin, S. Deltour, B.R. Rood, C. Guerardel, D. Leprince, The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38313–38324.
- [12] S. Deltour, S. Pinte, C. Guerardel, B. Wasyluk, D. Leprince, The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 4890–4901.
- [13] S. Deltour, C. Guerardel, D. Leprince, Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14831–14836.
- [14] C. Guerardel, S. Deltour, S. Pinte, D. Monte, A. Begue, A.K. Godwin, D. Leprince, Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3078–3089.
- [15] C. Britschgi, M. Rizzi, T.J. Grob, M.P. Tschan, B. Hugli, V.A. Reddy, A.C. Andres, B.E. Torbett, A. Tobler, M.F. Fey, Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1, *Oncogene* 25 (2006) 2030–2039.
- [16] Q. Zhang, S.Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J.V. Rocheleau, D.W. Piston, R.H. Goodman, Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 829–833.
- [17] W.Y. Chen, D.H. Wang, R.C. Yen, J. Luo, W. Gu, S.B. Baylin, Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses, *Cell* 123 (2005) 437–448.
- [18] N. Stankovic-Valentin, S. Deltour, J. Seeler, S. Pinte, G. Vergoten, C. Guerardel, A. Dejean, D. Leprince, An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 2661–2675.
- [19] C. Wang, L. Chen, X. Hou, Z. Li, N. Kabra, Y. Ma, S. Nemoto, T. Finkel, W. Gu, W.D. Cress, J. Chen, Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 1025–1031.
- [20] H.S. Kwon, M. Ott, The ups and downs of SIRT1, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 517–525.
- [21] K.J. Briggs, I.M. Corcoran-Schwartz, W. Zhang, T. Harcke, W.L. Devereux, S.B. Baylin, C.G. Eberhart, D.N. Watkins, Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma, *Genes Dev.* 22 (2008) 770–785.
- [22] M. Jenal, E. Trinh, C. Britschgi, A. Britschgi, V. Roh, S.A. Vorbürger, A. Tobler, D. Leprince, M.F. Fey, K. Helin, M.P. Tschan, The tumor suppressor gene *Hypermethylated in cancer 1* is transcriptionally regulated by E2F1, *Mol. Cancer Res.*, in press.

IV. Publication n°3

The scavenger chemokine receptor CXCR7 is a direct target gene of HIC1

Capucine VAN RECHEM*, Brian R. ROOD*, Majid TOUKA*, Sébastien PINTE*, Mathias JENAL, Cateline GUERARDEL, Keri RAMSEY, Didier MONTE, Agnès BEGUE, Mario P. TSCHAN, Dietrich A. STEPHAN et Dominique LEPRINCE.

The Journal of Biological Chemistry, sous presse.

*Premiers co-auteurs

Cet article s'inscrit dans la continuité du travail de Thèse de Sébastien Pinte (Université du Droit et de la Santé Lille II, 24 Septembre 2004), portant sur la caractérisation des gènes cibles de HIC1. L'expression forcée de HIC1 dans des cellules U2OS dérivées d'ostéosarcome humain, à l'aide d'un adénovirus, a permis, par comparaison avec des cellules infectées par la GFP (Green Fluorescent Protein), d'établir une liste de gènes cibles potentiels.

Tandis que *SIRT1*, gène cible bien défini au sein de fibroblastes primaires, n'est pas une cible dans ce modèle, l'un des gènes fortement réprimés, et ce de manière rapide après infection, laissant supposer un effet direct, est *CXCR7*.

Les sites de recrutement de HIC1 au sein du promoteur de ce gène ont été identifiés et, grâce à la technique de ChIP, j'ai pu montrer que *CXCR7* est un gène cible direct de HIC1. De plus, par la technique de ChIP séquentiel (ChIP-reChIP), j'ai pu identifier l'un des mécanismes de répression transcriptionnelle mis en place par cette protéine pour réprimer ce gène, c'est-à-dire le recrutement du corépresseur CtBP.

Scavenger Chemokine (CXC Motif) Receptor 7 (CXCR7) Is a Direct Target Gene of *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1)*^[5]

Received for publication, March 10, 2009, and in revised form, June 11, 2009. Published, JBC Papers in Press, June 12, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.022350

Capucine Van Rechem^{†1,2}, Brian R. Rood^{§1}, Majid Touka^{†1,3}, Sébastien Pinte^{†1}, Mathias Jenal[¶], Cateline Guérardel[‡], Keri Ramsey^{||}, Didier Monté[‡], Agnès Bégue[‡], Mario P. Tschan[¶], Dietrich A. Stephan^{||}, and Dominique Leprince^{†4}

From the [†]CNRS UMR 8161 "Institut de Biologie de Lille," Université de Lille NORD de France, Institut Pasteur de Lille, 59017 Lille, France, the [§]Children's National Medical Center, George Washington University School of Medicine, Washington, D. C. 20010, the [¶]Department of Clinical Research, Experimental Oncology/Hematology, University of Bern, CH-3010 Bern, Switzerland, and the ^{||}Neurogenomics Division, Translational Genomics Research Institute, Phoenix, Arizona 85004

The tumor suppressor gene *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1) that is epigenetically silenced in many human tumors and is essential for mammalian development encodes a sequence-specific transcriptional repressor. The few genes that have been reported to be directly regulated by *HIC1* include *ATOHL*, *FGFBP1*, *SIRT1*, and *E2F1*. *HIC1* is thus involved in the complex regulatory loops modulating p53-dependent and E2F1-dependent cell survival and stress responses. We performed genome-wide expression profiling analyses to identify new *HIC1* target genes, using *HIC1*-deficient U2OS human osteosarcoma cells infected with adenoviruses expressing either *HIC1* or *GFP* as a negative control. These studies identified several putative direct target genes, including *CXCR7*, a G-protein-coupled receptor recently identified as a scavenger receptor for the chemokine SDF-1/CXCL12. *CXCR7* is highly expressed in human breast, lung, and prostate cancers. Using quantitative reverse transcription-PCR analyses, we demonstrated that *CXCR7* was repressed in U2OS cells overexpressing *HIC1*. Inversely, inactivation of endogenous *HIC1* by RNA interference in normal human WI38 fibroblasts results in up-regulation of *CXCR7* and *SIRT1*. *In silico* analyses followed by deletion studies and luciferase reporter assays identified a functional and phylogenetically conserved *HIC1*-responsive element in the human *CXCR7* promoter. Moreover, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and ChIP upon ChIP experiments demonstrated that endogenous *HIC1* proteins are bound together with the C-terminal binding protein corepressor to the *CXCR7* and *SIRT1* promoters in

WI38 cells. Taken together, our results implicate the tumor suppressor *HIC1* in the transcriptional regulation of the chemokine receptor *CXCR7*, a key player in the promotion of tumorigenesis in a wide variety of cell types.

AAQ: A

HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) is a tumor suppressor gene that resides on the short arm of chromosome 17, a region that is frequently deleted and epigenetically silenced in human cancers (1–4). *HIC1* encodes a transcriptional repressor with five Krüppel-like C₂H₂ zinc fingers mediating DNA binding via its consensus binding site consisting of a 5'-(C/G)NG(C/G)-GGGCA(C/A)CC-3' sequence centered on a GGCA motif (2, 5). It also contains a central region that recruits CtBP⁵ corepressor complexes (6) as well as an N-terminal BTB-POZ domain capable of autonomous transcriptional repression (7).

Fn5

HIC1 is a direct target gene of p53 transactivation through a p53-responsive element (2, 8, 9). A regulatory feedback loop between *HIC1* and p53 has been deciphered in which *HIC1* directly represses the transcription of *SIRT1*, which deacetylates and thereby inactivates p53 (10, 11). Therefore, inactivation of one allele of *HIC1* results in the de-repression of *SIRT1* causing decreased p53-mediated transactivation of the remaining *HIC1* allele. In addition, *SIRT1* also deacetylates *HIC1* and thereby favors its SUMOylation, thus establishing optimal transcriptional repression (12). Recently, *HIC1*, *SIRT1*, and *E2F1* have also been implicated in a regulatory feedback loop because *HIC1* represses the *E2F1* promoter (13) and because *E2F1* is a crucial activator of *SIRT1* transcription in response to DNA damage, but *SIRT1* binds *E2F1* and deacetylates it thus inhibiting *E2F1*-mediated gene activation (14, 15).

Current evidence places *HIC1* inactivation as an initiating event in tumorigenesis because of the propensity of *Hic1*^{+/-} mice to form spontaneous tumors (16) and the presence of *HIC1* silencing events in pre-neoplastic conditions such as smoker's lung, colonic polyps, and cirrhotic liver (17). Elucidation of the tumorigenic mechanisms initiated by *HIC1* inactivation is dependent upon the identification of the genes tar-

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant 5K12HD001399-05 from the NICHD (a Child Health Research career development award to B. R. R.). This work was also supported in part by funds from CNRS, Association for International Cancer Research (St. Andrews, United Kingdom), the Pasteur Institute and Association pour la Recherche Contre le Cancer, Hope Street Kids Grants 3586 and 3983 (to D. L.), the Swiss Federation against Cancer/Oncosuisse Grant OCS-01823-02-2006, and the Werner and Hedy Berger-Janser Foundation of Cancer Research (to M. P. T.).

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Tables S1–S3 and Figs. S1–S2.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie and from the Association pour la Recherche Contre le Cancer.

³ Held a postdoctoral fellowship from the Association for International Cancer Research. Present address: Invitrogen, 3 Fountain Dr., Inchinnan Business Park, Paisley PA4 9RF, United Kingdom.

⁴ To whom correspondence should be addressed: CNRS UMR 8161 "Institut de Biologie de Lille," 1 Rue Calmette, BP 447, 59017 Lille Cedex, France. Tel.: 33-3-20-87-1119; Fax: 33-3-20-87-1111; E-mail: dominique.leprince@ibl.fr.

⁵ The abbreviations used are: CtBP, C-terminal binding protein; GFP, green fluorescent protein; Ad-GFP, adenovirus encoding green fluorescent protein; qRT, quantitative reverse transcription; shRNA, short hairpin RNA; ChIP, chromatin immunoprecipitation; HiRE, *HIC1*-responsive element; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

HIC1 Regulates CXCR7

geted by HIC1-mediated transcriptional repression. To identify these target genes, we created an adenoviral vector encoding a FLAG-HIC1 fusion protein and infected U2OS osteosarcoma cells, a cell line known to have lost *HIC1* expression. Gene expression profiling was used to identify putative target genes, and confirmatory studies were then performed. Collectively, these studies identified *CXCR7* as a direct transcriptional target of HIC1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of Replication-defective Recombinant Adenoviral Vectors—A HindIII-XbaI fragment containing the coding sequence of human HIC1 fused to an in-frame N-terminal FLAG epitope was prepared from the pcDNA3-FLAG-HIC1 vector (6) and cloned into the pAdCMV2 vector. Recombinant adenovirus vectors (Ad-FLAG-HIC1) were obtained as described previously (18). The recombinant adenovirus encoding green fluorescent protein (Ad-GFP) has been described previously (8).

Expression Profiling—U2OS cells were infected by adding virus stocks directly to the culture medium at an input multiplicity of 100 viral particles/cell (18). At nine time points after adenoviral infection (from 8 to 26 h), total RNA was isolated from each sample using TRIzol reagent (Invitrogen). 6.0 μ g of total RNA from each sample was then converted to double-stranded cDNA using the SuperScript Choice System (Invitrogen). cDNA was purified using a phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction. Clean cDNA was used for the *in vitro* synthesis of biotin-labeled cRNA using the BioArray RNA transcript labeling kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). cRNA was cleaned using RNeasy mini kits (Qiagen, Valencia, CA) and fragmented randomly to \sim 200 bp. Labeled cRNAs were hybridized to human HG-U133A chips (Affymetrix) for 16 h. Each chip was scanned using a confocal laser scanner after staining with streptavidin phycoerythrin followed by a signal-amplifying second antibody. Data analysis was performed using the Affymetrix Microarray Suite 5.0 software to generate an absolute analysis for each chip. Each chip was scaled to a target intensity value of 150 to allow for inter-array comparisons. Per gene normalizations were performed by normalizing the genes in each HIC1 chip to their corresponding gene on the control GFP chip for each of the time points. Genes that were flagged as absent across all time points for both cell types were removed from the analysis. Self-organizing maps were used to identify major trends in expression. Raw data can be obtained at NCBI GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov), accession number GSE9854, or the Children's National Medical Center Public Expression Profiling Resource site.

Western Blot and Antibodies—Proteins were fractionated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes that were treated as described previously (6). Antibodies against HIC1 (325 and 2563) have been described previously (6). Anti-FLAG M2 (F3165, Sigma) is a monoclonal antibody directed against the epitope tag. We have also used monoclonal antibodies against Hsp60 (sc-13115, Santa Cruz Biotechnology) and polyclonal antibodies against CtBP1 (C8741, Sigma). The secondary antibodies were anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins and a horseradish peroxidase-linked whole antibody from Amersham Biosciences.

Generation of a Stable HIC1 Knockdown Cell Line—pLKO1 lentiviral vectors expressing short hairpin (sh) RNAs targeting HIC1 were purchased from Sigma. Two shRNAs (clone ID; NM_006487.1-1763s1c1 and 1-1982s1c1) that have been shown to efficiently knock down *HIC1* mRNA (19) as well as a control shRNA (nontargeting shRNA vector, SHC002, Sigma) were used in these experiments. These vectors contain a puromycin resistance gene for selection of the transduced cells. Lentivirus production, transduction of cells, and selection of the transduced cells for 1 week using 2.0 μ g/ml puromycin was performed as described (19).

Construction of Plasmids, Transient Transfection, and Luciferase Repression Assays—The *CXCR7* promoter region was PCR-amplified from genomic DNA extracted from peripheral blood lymphocytes of healthy donors using forward and reverse primers containing KpnI and XhoI restriction sites (supplemental Table S1). After restriction digestion, the fragment was cloned in the pGL3 basic reporter gene vector to generate the *CXCR7* promoter construct, pGL3 *CXCR7* $-813/+168$. The $-386/+164$, $-191/+164$, and $-26/+164$ *CXCR7* promoter constructs were prepared from this construct by PCR (supplemental Table S1). The $-191/+164$ and $-26/+164$ Δ XI mutants were generated by the two-round PCR strategy with the following mutant oligonucleotides: sense CAAAGCCAT-CATCTAGAGGGC and antisense CCTCTAGATGATGGCTTTTGTAAACCC, in which TGC in the HiRE site is replaced by CAT, a mutation shown to abolish HIC1 binding (5). The $-863/+168$ Δ XI construct has been obtained through restriction fragment swapping using a unique SpeI site (position -75 to -70). Briefly, the KpnI-SpeI fragment from the $-863/+168$ construct was exchanged with the small KpnI-SpeI fragment from the $-26/+164$ Δ XI mutant. All constructs were verified by nucleotide sequencing.

U2OS cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the polyethyleneimine (Euromedex) method in 12-well plates with 500 ng of DNA (20). Cells were transfected for 6 h and then were incubated in fresh complete medium. They were rinsed in cold phosphate-buffered saline 48 h after transfection and lysed with the luciferase assay buffer. Luciferase and β -galactosidase activities were measured by using, respectively, beetle luciferin (Promega) and the Galacto-light kit (Tropix) with a Berthold chemiluminometer. After normalization to β -galactosidase activity, the data were expressed as fold activation relative to the empty pGL3 basic control vector. Results represented are the mean values and standard deviations from at least two independent transfections in triplicate.

Quantitative RT-PCR—Total RNA was reverse-transcribed using random primers and MultiScribeTM reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real time PCR analysis was performed by FastStart DNA Master SYBR Green I PCR (Roche Applied Science) in a LightCycler fluorescence temperature cyler (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. The primers for *SIRT1* and *CXCR7* as well as control primers for actin and GAPDH are summarized in supplemental Table S2. Primers were used at a concentration of 0.5 μ M. According to a melting point analysis, only one PCR product was amplified

HIC1 Regulates CXCR7

under these conditions. RNAs extracted from U2OS Ad-GFP were used to generate a standard curve for each gene. Results were normalized with respect to the internal controls and are expressed relative to the levels found in Ad-GFP-infected U2OS cells. Similar experiments were performed with cells transduced by the control shRNA or the shRNA targeting *HIC1*.

Chromatin Immunoprecipitation—ChIP was performed according to published protocols with slight modifications. Briefly, formaldehyde was added directly to the cultured cells to a final concentration of 1% for 10 min at 37 °C. The cross-linking was stopped by adding glycine to a final concentration of 0.125 M. After 5 min at 37 °C, cells were lysed directly in the plates by resuspension in cell lysis buffer for 5 min. Then the samples were pelleted, resuspended in nuclei lysis buffer, and sonicated to chromatin with an average size of 500 bp using a BioRuptor (Diagenode, Liege, Belgium). After preclearing with a 50% slurry of protein A-G beads preincubated with salmon sperm DNA and bovine serum albumin for 4 h at 4 °C, the chromatin was incubated with the anti-HIC1 antibodies, normal rabbit IgG, or with no antibodies overnight. The antibody-bound chromatin was then pooled down for 30 min with protein A-G beads, washed extensively, and eluted two times with 250 μ l of elution buffer. After addition of 20 μ l of 5 M NaCl, the cross-linking was reversed by overnight incubation at 65 °C. The immunoprecipitated DNAs as well as whole cell extract DNAs (input) were purified by treatment with RNase A and then proteinase K followed by purification on Nucleobond Extract II (Macherey-Nagel). The purified DNAs were used for PCR analyses using the relevant primers for *SIRT1*, *CXCR7*, and *GAPDH* (see supplemental Table S3).

For ChIP upon ChIP experiments, we started with 8-fold more cells than in the single ChIP experiment. After the first round of immunoprecipitation, the beads were pooled by centrifugation in TE buffer and incubated in 100 μ l of elution buffer for 10 min at 65 °C. After centrifugation, the supernatant was diluted in 900 μ l of IP buffer and incubated with the second antibody as in a single ChIP experiment.

RESULTS

HIC1 Expression in U2OS Cells Using an Adenoviral Vector Results in a Proliferation Arrest—U2OS cells were infected with Ad-FLAG-HIC1 or Ad-GFP at a multiplicity of infection of 100 that was determined experimentally to allow infection of 90–100% of the cells as shown by immunofluorescence analyses at 24 h after infection. HIC1 proteins display a nuclear punctate localization typical of BTB/POZ proteins (Fig. 1A).

Examination of the kinetics of infection over 48 h demonstrated that Ad-FLAG-HIC1 proteins can be detected by Western blotting as early as 16 h post-infection (Fig. 1B). Ectopic overexpression of HIC1 resulted in a proliferation arrest starting around 16 h, coinciding with the detectability of the FLAG-HIC1 protein (Fig. 1C). U2OS cells infected with the control Ad-GFP virus did not undergo proliferation arrest.

Microarray Analyses Identify HIC1-activated and HIC1-repressed Genes—To obtain a profile of HIC1-regulated genes, we prepared total RNAs from U2OS cells infected at a multiplicity of infection of 100 with Ad-FLAG-HIC1 or Ad-GFP as control

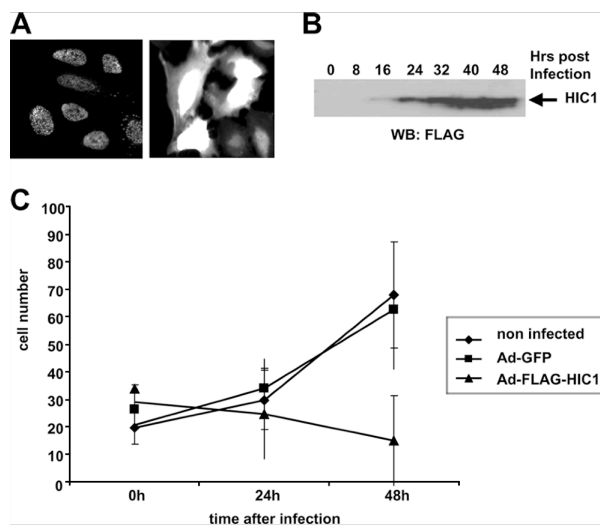


FIGURE 1. HIC1 overexpression in U2OS osteosarcoma cells induces a proliferation arrest. A, expression of HIC1 and GFP in infected U2OS cells. U2OS cells were infected with Ad-FLAG-HIC1 (left panel) or Ad-GFP (right panel), and 24 h later the expression of HIC1 and GFP was analyzed. The HIC1 protein is detected by immunofluorescence with the anti-FLAG M2 monoclonal antibody in a punctate nuclear pattern. B, expression of HIC1 proteins in Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells. Equal amounts of total protein extracts were subjected to Western blotting (WB) using the anti-FLAG monoclonal antibody. C, overexpression of HIC1 through adenoviral infection induces a growth arrest in U2OS cells. U2OS osteosarcoma cells were seeded in 60-mm plates and infected with Ad-FLAG-HIC1 or Ad-GFP at a multiplicity of infection of 100 to allow infection of at least 90% of the cells. At the indicated times, cell counts were made on five microscopic fields, and each point is representative of the average number of noninfected control cells, Ad-FLAG-HIC1, and Ad-GFP U2OS-infected cells.

and extracted every 2 h starting at 8 until 26 h post-infection. Multiple infection time points provided independent sets of experiments that allowed the identification of early regulated genes that are more likely to be direct target genes. These RNAs were then used to interrogate the Affymetrix Human Genome U133A chip containing 14,500 transcripts. Direct comparisons were performed between Ad-FLAG-HIC1 and Ad-GFP-infected cells for each time of infection. These analyses revealed that 81 genes were down-regulated more than 3-fold, whereas 23 were up-regulated more than 3-fold after 16 and 24 h of infection, respectively (Tables 1 and 2). Upon closer analysis of the differentially expressed genes, it became apparent that the repressed genes were observed early post-infection, whereas the activated genes were predominantly found later in the infection kinetics, suggesting that they are not direct HIC1 target genes in keeping with the known function of HIC1 as a transcriptional repressor. Strikingly, *SIRT1*, a direct HIC1 target gene in WI38 cells (10), was not repressed in the Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells; rather it was slightly activated (Fig. 2A). These microarray data were confirmed by qRT-PCR using RNAs from the 16-h time point (Fig. 2B).

Thus, *SIRT1* is not a HIC1 target gene in the Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells as has also been shown in an Ad-HIC1-infected human D245 medulloblastoma cell line (21). Nevertheless, our results are in close agreement with the well established function of HIC1 as a transcriptional repressor (5–7).

HIC1 Regulates CXCR7

TABLE 1

Genes repressed more than 3-fold in Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells at 16 h of infection

Repressed gene name	Relative expression at 16 h	Affymetrix probe set no.	Chromosomal location
	%		
<i>SNAP 43, SNAPC1</i>	9	205443_at	14q22
<i>TRIM16, TRIM16L</i>	17	204341_at	17p11.2
<i>MAP2K3</i>	18	215498_s_at	17q11.2
<i>PLEC1</i>	18	201373_at	8q24
<i>RDC1, CXCR7</i>	20	212977_at	2
<i>TNS3</i>	20	217853_at	7p12.3
<i>LIF</i>	20	205266_at	22q12.2
<i>WDR6</i>	21	217734_s_at	15q21
<i>AMIGO2</i>	21	222108_at	7
<i>MAP2K5</i>	21	211371_at	15q22.2-q22.31
<i>GRSF1</i>	22	215030_at	4q13.3
<i>FADS1</i>	23	208963_x_at	11q12.2-q13.1
<i>CYP24A1</i>	23	206504_at	20q13
<i>ADORA2B</i>	23	205891_at	17p12-p11.2
<i>KIAA1026</i>	25	213478_at	1p36.13
<i>RIN2</i>	26	209684_at	20p11.22
<i>LRP8</i>	26	205282_at	1p34
<i>MCAM</i>	27	209086_x_at	11q23.3
<i>ADRB2</i>	27	206170_at	5q31-q32
<i>TMEM16B</i>	28	220111_s_at	12
<i>CNND1</i>	29	208712_at	11q13
<i>AHNAK2</i>	29	212992_at	14
<i>KCNJ6</i>	30	214126_at	21q22.13-q22.2
<i>LRP8</i>	30	208433_s_at	1p34
<i>CA12</i>	30	203963_at	15q22
<i>DRAL, SLIM3, FHL2</i>	31	202949_s_at	2q12-q14
<i>JNHBA</i>	31	210511_s_at	7p15-p13
<i>NOV</i>	31	214321_at	8q24.1
<i>SFXN3</i>	32	220974_x_at	10q24.2
<i>SNAP-25</i>	32	202508_s_at	20p12-p11.2
<i>EPHA2</i>	32	203499_at	1p36
<i>SOX9</i>	33	202935_s_at	17q24.3-q25.1
<i>CXCL14</i>	33	218002_s_at	5q31

TABLE 2

Genes activated more than 3-fold in Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells at 24 h of infection

Up-regulated gene name	Relative expression at 24 h	Affymetrix probe set no.	Chromosomal location
	%		
<i>CA2</i>	974	209301_at	8q22
<i>MMP12</i>	744	204580_at	11q22.3
<i>ID4</i>	644	209291_at	6p22-p21
<i>SMPDL3A</i>	464	213624_at	6q22.31
<i>LPPR4</i>	460	213496_at	1p21.2
<i>CCNE2</i>	448	205034_at	8q22.1
<i>C14orf45</i>	447	220173_at	14q24.3
<i>ACTA2</i>	442	200974_at	10q23.3
<i>TNFAIP8</i>	413	210260_s_at	5q23.1
<i>CDO1</i>	407	204154_at	5q22-q23
<i>SLC7A11</i>	393	207528_s_at	4q28-q32
<i>CYP7B1</i>	386	207386_at	8q21.3
<i>TMEM62</i>	384	218776_s_at	15q15.2
<i>KIAA0895</i>	371	213424_at	7p14.2
<i>PLA2G4A</i>	356	210145_at	1q25
<i>FST</i>	355	204948_s_at	5q11.2
<i>ABHD3</i>	333	213017_at	18q11.2
<i>SPP1</i>	333	209875_s_at	4q21-q25
<i>GPR161</i>	328	214104_at	1q24.2
<i>LGALS8</i>	325	210732_s_at	1q42-q43
<i>TMEM47</i>	316	209656_s_at	Xp11.4
<i>SRGN</i>	310	201859_at	10q22.1
<i>ITPR1</i>	307	203710_at	3p26-p25

Down-regulation of CXCR7 in Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS Cells—Among the genes most markedly repressed in HIC1-overexpressing U2OS cells, we decided to focus our efforts on the orphan G protein-coupled receptor *RDC1* because of its relevance to cancer and the presence of HIC1

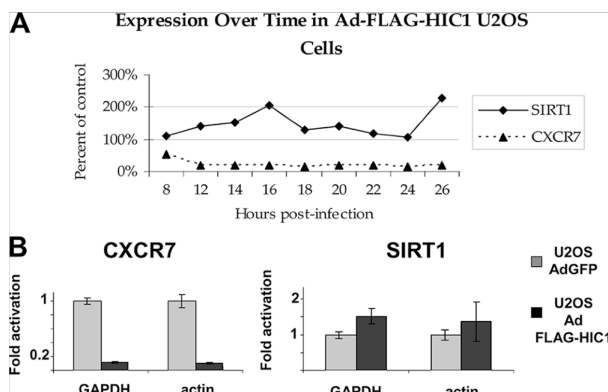


FIGURE 2. CXCR7 is down-regulated in Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells, whereas SIRT1 is activated. *A*, expression levels of *CXCR7* and of *SIRT1*. Total RNAs from U2OS cells (HIC1 null) infected with Ad-FLAG-HIC1 and Ad-GFP were prepared at the indicated times after infection (from 8 to 26 h), and Affymetrix HG U133A chips were used to measure the gene expression. Expression values were normalized to Ad-GFP-infected control cells at the same time points. The Percent of control corresponds to the ratio between the expression levels of *CXCR7* and *SIRT1* measured in Ad-GFP and in Ad-FLAG-HIC1-infected cells at each time point. *B*, confirmation of the microarray results for *CXCR7* and *SIRT1* by quantitative RT-PCR. qRT-PCR analyses were performed using total RNAs isolated from U2OS cells infected (time course point 16 h) with Ad-GFP (gray boxes) or with Ad-FLAG-HIC1 (black boxes) for *CXCR7* (left column) and *SIRT1* (right column). Values were normalized to GAPDH or actin as indicated.

consensus binding sites in the regulatory region of the gene. *RDC1* has been recently “deorphanized” as the scavenger chemokine receptor *CXCR7* that binds chemokine CXCL11 and CXCL12, also known as SDF-1 (stromal-derived factor) (22, 23). *CXCR7* is expressed in a variety of breast, lung, prostate, and others cancers (24) and promotes their growth *in vivo* (25). After infection by Ad-FLAG-HIC1, *CXCR7* was specifically down-regulated 5–7-fold (Fig. 2A), as confirmed by Northern blot analyses (data not shown) and by qRT-PCR (Fig. 2B, left panel). Collectively, these data suggested that *CXCR7* is a target gene of HIC1 in U2OS cells infected by Ad-FLAG-HIC1.

HIC1 mRNA Knockdown Increases CXCR7 and SIRT1 Expression in Normal WI38 Fibroblasts—All the previous results were obtained by ectopic HIC1 expression through infection with adenovirus of transformed cell lines not expressing endogenous HIC1. To validate *CXCR7* as a HIC1 transcriptional target in a more physiological situation, we used RNA interference with a lentiviral shRNA against *HIC1* to reduce endogenous *HIC1* expression in normal human WI38 fibroblasts. These cells were chosen because they express HIC1 (supplemental Fig. S1) and have previously been used to validate *SIRT1* as a direct HIC1 target gene (10). To that end, we generated WI38 cell lines expressing a nontargeting control shRNA (SHC002) and two cell lines expressing shRNAs targeting *HIC1* (shHIC1 1763 and shHIC1 1982), as shown previously in HL60 acute myeloid leukemia cells (19). qRT-PCR analyses demonstrated an efficient, roughly 50%, knockdown of *HIC1* in the WI38 shHIC1 1763 and 1982 cell lines as compared with the cells infected with the control shRNA (Fig. 3A). Similar analyses using the same RNA samples detected a 2-fold increase in *CXCR7* expression (Fig. 3B) and a 1.5-fold up-regulation of *SIRT1* (Fig. 3C). These results demonstrate that knockdown of

HIC1 Regulates CXCR7

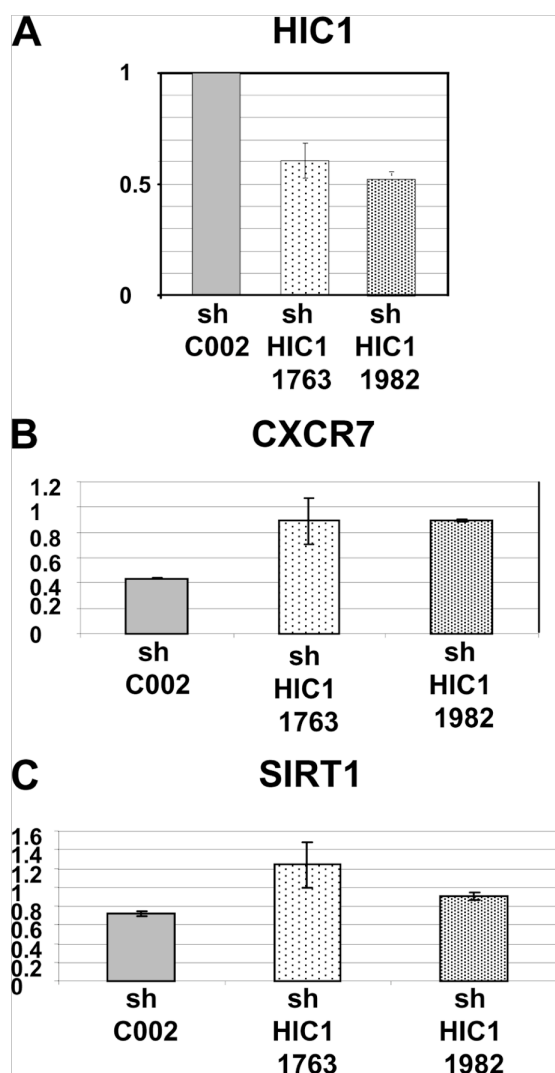


FIGURE 3. Inactivation of endogenous HIC1 in normal WI38 fibroblasts up-regulates CXCR7 and SIRT1 expression. A, WI38 cells were infected with the lentiviruses expressing a control shRNA (*SHC002*) and two shRNAs (*SH1763* and *SH1982*) targeting *HIC1* (Mission shRNAs; Sigma) as described previously (19). Total RNAs were extracted, and expression levels of *HIC1* mRNA were assessed with real time quantitative PCR as described (9, 19). B, level of HIC1 proteins was checked by Western blot analyses as described previously. HSP60 was used as a loading control. C, similarly, the expression levels of *SIRT1* and *CXCR7* were assessed using specific oligonucleotides (see supplemental Table S2). Values were normalized to actin.

endogenous *HIC1* in normal human WI38 fibroblasts results in up-regulation of *CXCR7* as well as of *SIRT1*, as shown previously (10).

Repression of CXCR7 Promoter by HIC1—All the above described results demonstrate that *CXCR7* is a HIC1 target gene. To determine whether *CXCR7* is a direct target gene of HIC1, we first scanned its promoter region for the presence of consensus HIC1-responsive elements (HiRE, 5'-(C/G)NG(C/G)-GGGCA(C/A)CC-3') centered on a GGCA (reverse TGCC) core motif (5). These analyses identified 11 putative HiRE to which HIC1 could directly bind through its Krüppel-like C₂H₂

zinc fingers, some of which are conserved in primate (human and chimpanzee) and rodent (rat and mouse) genomes (Fig. 4A and supplemental Fig. S2).

To directly assess the ability of HIC1 to repress transcription of *CXCR7* through these sites, we cloned ~0.8 kbp of genomic DNA upstream of the transcription start site and first noncoding exon of *CXCR7*, as defined in GenBank™ (NM_020311; gi 114155149), and performed luciferase promoter-reporter assays. To this end, the -813/+168 promoter region of *CXCR7* was cloned in the pGL3 basic reporter vector, and a series of deletion constructs were made that gradually eliminated the putative HiREs (Fig. 4, A and B). These constructs were then transfected alone or with the pcDNA3 FLAG-HIC1 expression vector into U2OS cells, and promoter activities were thus measured in the absence or presence of HIC1. As shown in Fig. 4B, transient transfection of HIC1 significantly repressed the strong *CXCR7* promoter activity in the -813/+168, -386/+164, and -191/+164 constructs. Interestingly enough, this repression is still elevated in the smaller construct -26/+164.

These results suggest that the regulatory region primarily involved in the HIC1-mediated repression of *CXCR7* is located in the -26/+164 upstream region of the promoter. Notably, this region contains only one of the two phylogenetically conserved and adjacent HiREs (sites IX and XI) found in the same reverse orientation (5'-TGCC-3') as in the *SIRT1* promoter (10) (Fig. 4A and supplemental Fig. S2). The HiRE site IX, which is present in the -191/+164 construct, does not seem to be essential because its absence in the -26/+164 construct does not significantly impair the HIC1-mediated repression (Fig. 4B).

We thus introduced into this XI HiRE site a mutation (TGC into CAT) previously shown to abolish HIC1 binding (Fig. 5A) (5). The -191/+164 and -26/+164 constructs both display a high basal activity repressed by HIC1 expression (Fig. 4B). However, these two mutated ΔXI constructs are not significantly repressed in the presence of transfected HIC1 (Fig. 5B). Thus, these results demonstrate that this conserved site XI is essential for HIC1-mediated repression, whereas the nonconserved site 10 has little or no effect. In addition, the mutation of this XI site in the context of the longest promoter construct (-813/+168) results in a significant decrease of repression by HIC1 (Fig. 5C). In conclusion, the *CXCR7* promoter is negatively regulated by HIC1 in transient transfection assays, strongly suggesting that *CXCR7* is a direct HIC1 target gene.

CXCR7 and SIRT1 Are Direct HIC1 Target Genes in Two Different Human Cell Types Expressing Endogenous HIC1 Proteins—To confirm that *CXCR7* is indeed a direct target gene of HIC1 in a more physiologically relevant system, we performed ChIP assays in two different human cell types that express endogenous HIC1 proteins as follows: normal human fibroblast WI38 cells (10) and Ewing/PNET SK-N-MC cells (supplemental Fig. S1). As a positive control for specificity, we used primers flanking the previously identified HiRE in the *SIRT1* promoter in our ChIP-PCR analysis (10). As negative control, we used primers located in the GAPDH promoter. As shown in Fig. 6, we were able to specifically amplify the region encompassing the HiREs in the *SIRT1* promoter from both WI38 and SK-N-MC chromatin immunoprecipitated by our

HIC1 Regulates CXCR7

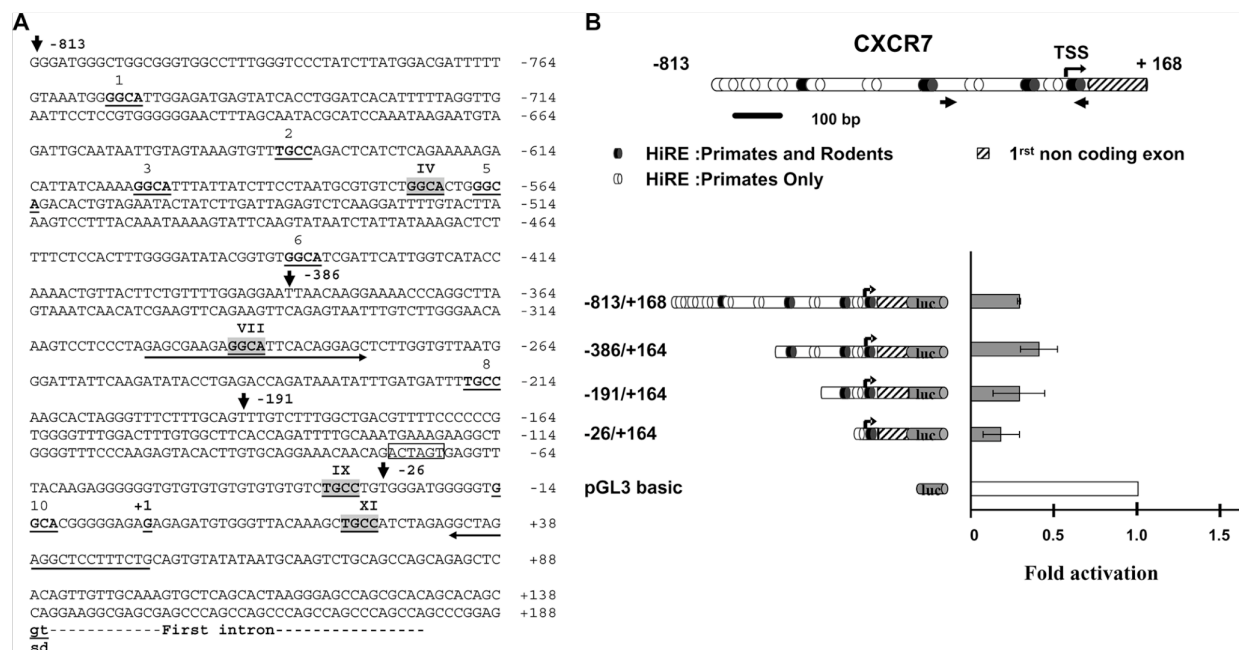


FIGURE 4. CXCR7 is down-regulated by HIC1. *A*, nucleotide sequence of the 5' region of the human *CXCR7* gene. The transcription start site as well as the first noncoding exon are described in GenBank™ under accession number NM_020311; gi 114155149. The conserved gt dinucleotides of the splice donor site (*sd*) are indicated in boldface letters and underlined. Upstream genomic sequences were extracted from the human genome sequence (NC_000002). Potential HiREs are indicated with the 4-bp core consensus 5'-GGCA-3' (reverse complement strand TGCC) shown in boldface and underlined (5). These sites are numbered from 1 to 11. The sites indicated by roman numerals and highlighted in light gray boxes are those conserved in the primate (human and chimpanzee) and rodent (mouse and rat) genomes (see also supplemental Fig. 3 for a CLUSTAL alignment). The 5' boundaries of the various deletions in the *CXCR7* promoter obtained by PCR are indicated by arrows with the numbering relative to the +1 position of the transcription initiation site. A unique Spel site (position -75 to -70) used to obtain the -863/+168 ΔX1 construct is boxed. Primers used to amplify the *CXCR7* promoter fragment in the ChIP experiment presented in Figs. 6 and 7 are indicated by an arrow. *B*, from top to bottom, a schematic drawing of the 5' promoter region and the first noncoding exon of *CXCR7* is shown. Numbering is relative to the transcription start site (TSS) (bent arrow, position +1). The potential HiREs (5) are shown as black ovals for those found in the primate and rodent genomes or as white ovals for those found only in the primate genomes. The small arrows indicate the position of the primers used to amplify the relevant region of *CXCR7* in the ChIP and ChIP upon ChIP experiments. The left panel shows a schematic drawing of various fragments of the human *CXCR7* first noncoding exon 5' sequences subcloned in the luciferase reporter plasmid pGL3 basic. Reporter constructs were transfected in triplicate into U2OS cells and assayed for luciferase activity. Luciferase (*Luc*) activity was normalized for transfection efficiency using a co-transfected β-galactosidase reporter. Repression of transcription of each construct by HIC1 was calculated by first dividing luciferase activity in the absence of HIC1 by the activity in the presence of HIC1 (normalized for transfection efficiency using a co-transfected β-galactosidase reporter). The value obtained for each construct was then divided by the repressive effect elicited by HIC1 on the empty pGL3 basic vector to obtain the final fold of activation. Results, expressed relative to a value of 1.0 for cells transfected with the pGL3 empty vector, are expressed as the mean of three different experiments, and error bars represent standard deviations.

ZSI

polyclonal anti-HIC1 antibody (6) but not by normal rabbit IgG. Primers designed to amplify the 5' region upstream of the GAPDH promoter did not yield a product, further demonstrating the specificity of this ChIP assay.

To test the promoter of *CXCR7*, we designed primers sets to amplify the region mediating the repressive effects of HIC1 on this promoter in transient transfection assays and containing adjacent HiREs (Fig. 4B, black arrows, and supplemental Table S3). These primers were used in PCR experiments using the same WI38 and SK-N-MC chromatin samples as above. *CXCR7* was readily amplified from the HIC1-immunoprecipitated WI38 and SK-N-MC chromatin but not from chromatin immunoprecipitated by the control rabbit IgG, as shown previously for *SIRT1* (Fig. 6, A and B). Taken together, these results demonstrate that endogenous HIC1 proteins are recruited onto the *SIRT1* and *CXCR7* promoters *in vivo* both in normal WI38 fibroblasts and in transformed SK-N-MC cells.

Co-occupancy of HIC1 and Its Co-repressor CtBP on the CXCR7 and SIRT1 Promoters—We have previously identified CtBP as a co-repressor of HIC1 (6, 11). We thus performed sequential chromatin immunoprecipitation assays (ChIP upon

ChIP) to determine whether these two proteins are found co-localized on endogenous HIC1 target genes. In brief, WI38 chromatin was subjected to a first round of immunoprecipitation as described above. Then the bound material was eluted, and equal amounts were subjected to a second round of immunoprecipitation with anti-CtBP antibodies or normal rabbit IgG. A band corresponding to the relevant regions of the *SIRT1* (10, 11) and *CXCR7* promoters was detected in the HIC1/CtBP but not in the HIC1/IgG ChIP upon ChIP (Fig. 7). Primers designed to amplify the 5' region upstream of the GAPDH promoter did not yield a product, further demonstrating the specificity of our assay.

In conclusion, HIC1 and the co-repressor CtBP could form a complex at the *SIRT1* and *CXCR7* promoters in normal WI38 fibroblasts, likely resulting in their direct transcriptional repression.

DISCUSSION

Since its discovery in 1995 (2), a large body of information has been accumulated about *HIC1*, which is now recognized as a *bona fide* tumor suppressor gene (reviewed in Ref. 4). *Hic1*^{+/-}

ZSI

F7

HIC1 Regulates CXCR7

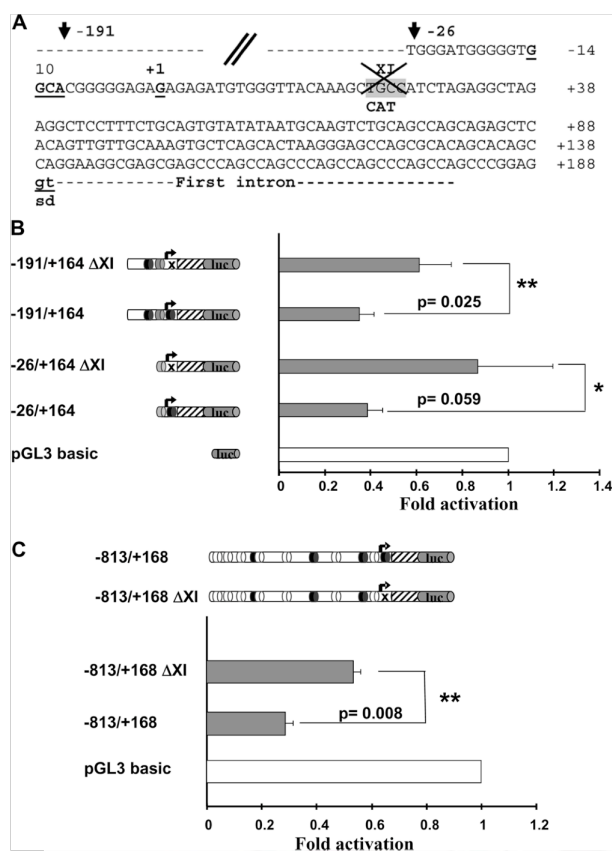


FIGURE 5. Phylogenetically conserved HiRE XI is essential for the transcriptional repression of CXCR7. *A*, nucleotide sequence of the 5' region of the human *CXCR7* gene showing the mutation introduced into the conserved HiRE XI site (TGC in the core motif replaced by CAT) to impede HIC1 binding (5). *B*, reporter constructs schematically shown in the left panel were transfected in triplicate into U2OS cells and assayed for luciferase activity. Luciferase (*Luc*) activity is shown in the right panel (gray boxes). Repression of transcription of each construct by HIC1 was calculated exactly as detailed in legend to Fig. 4B. Results, expressed relative to a value of 1.0 for cells transfected with the pGL3 empty vector, are expressed as the mean of four different experiments, and error bars represent standard deviations. The *p* values are indicated (*, *p* values < 0.5; **, *p* values < 0.05). *C*, same experiments were performed with the -813/+168 wild-type and ΔXI constructs. The results are the mean of two independent transfections in triplicate with the *p* value indicated as in *B*.

heterozygous mice spontaneously develop an age- and gender-dependent spectrum of tumors (16), and the epigenetically silenced *Hic1* gene cooperates with p53 to determine cancer prevalence, progression, and spectrum (26). In fact, HIC1 is implicated in a complex regulatory feedback loop with p53 and the class III deacetylase SIRT1 (10) through direct transcriptional regulation mechanisms (2, 8, 9) as well as post-translational modifications (12, 15, 27, 28). HIC1 encodes a sequence-specific transcriptional repressor belonging to the BTB/POZ and Krüppel C₂H₂ zinc finger subfamily (2). However, despite this wealth of information, only four genes directly regulated by HIC1 have been identified to date either by induction, *SIRT1* (10), or by promoter analysis and mutagenesis such as *FGF-BP1* and *E2F1*. The *FGF-BP1* gene is repressed by HIC1 following transforming growth factor-β treatment (29). Recently, it has been shown that HIC1 represses the *E2F1* promoter in serum-

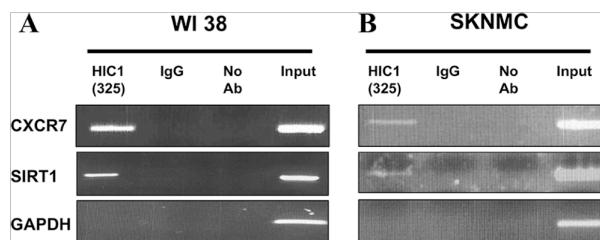


FIGURE 6. ChIP analyses of HIC1 on CXCR7 and SIRT1 promoters. Normal human WI38 fibroblasts (*A*) or transformed human SK-N-MC Ewing/PNET cells (*B*) that both express endogenous HIC1 proteins (see supplemental Fig. 1) were cross-linked with 1% formaldehyde. Cross-linked chromatin immunoprecipitated (*IP*) with polyclonal anti-HIC1 antibody (*Ab*) (325), with rabbit IgG, or no antibody were used in PCR amplification with primers flanking the functional HiREs identified by our luciferase assays in the *CXCR7* promoter. The region previously identified in the *SIRT1* promoter in WI38 cells (10) was used as positive control, whereas PCR with the 5' promoter of GAPDH was used as an internal nonbinding control (10). An H₂O control corresponding to PCR without DNA yielded no amplified products (data not shown). Representative gels of one ChIP among three experiments are shown.

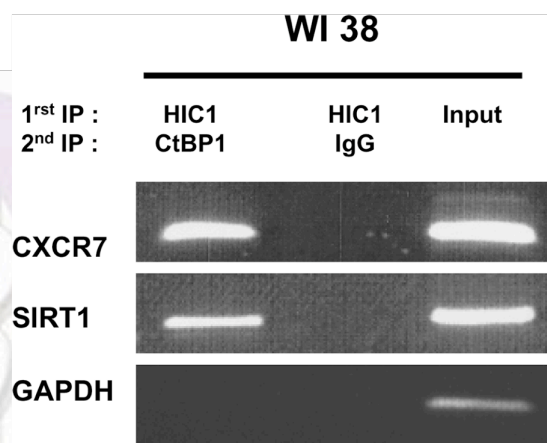


FIGURE 7. ChIP upon ChIP assays demonstrate that HIC1 and CtBP might form a stable complex on SIRT1 and CXCR7 promoters. Normal human WI38 fibroblasts were cross-linked with 1% formaldehyde. Cross-linked chromatin was sonicated and immunoprecipitated with polyclonal anti-HIC1 antibody (325) (1st IP HIC1). The bound material was eluted, divided in two, and subjected to a second round of immunoprecipitation with anti-CtBP antibodies (2nd IP CtBP1) or with normal rabbit IgG (2nd IP IgG). PCR amplifications were performed using primers flanking the functional HiREs previously identified in *SIRT1* (10) and in *CXCR7* (this study). PCR with the 5' promoter of GAPDH was used as an internal nonbinding control as described in Fig. 6. Representative gels of one ChIP upon ChIP among two experiments are shown.

starved HSF8 human fibroblasts through recruitment of Brg1 (13) and that E2F1 activates the transcription of *HIC1* (40), thus generating another regulatory loop. Finally, microarray analyses based on the *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} model of medulloblastoma identified *ATOH1* (21). In addition to its role as a tumor suppressor gene, *Hic1* is also essential for normal development as shown by the embryonic lethal phenotype of mice bearing homozygous *Hic1* deletion (30). As the four known HIC1 target genes are unlikely to fully account for the effects of *HIC1* deletion, it stands to reason that the majority of HIC1 target genes remains to be discovered.

This study is the second attempted genomic analysis of HIC1 target genes through microarray gene expression profiling (21). Expression changes at various time points were monitored after

HIC1 Regulates CXCR7

HIC1 re-expression in transformed U2OS cells that have lost endogenous HIC1 expression but are wild type for p53, retinoblastoma protein, and Brg1. This model is physiologically relevant because double-cis *Hic1*^{+/-} *p53*^{+/-} heterozygous mice develop osteosarcomas and can also be correlated with human osteosarcomas that frequently harbor hypermethylation of HIC1 in tumors with p53 mutations (26). We used RNAs extracted from 8 to 26 h post-infection allowing us to identify genes repressed at the earliest time points after infection, which are more likely to represent a "first wave" of direct target genes. At 16 h, Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells overexpressed moderately the FLAG-HIC1 protein but were already growth-arrested (Fig. 1).

In our time course experiment, we identified a total of 81 genes whose expression was down-regulated at least 3-fold after 16 h of infection with Ad-FLAG-HIC1, whereas 23 genes were up-regulated at least 3-fold after 26 h (Tables 1 and 2). Strikingly, *SIRT1*, one of the four HIC1 target genes described so far, was not repressed but was rather activated (~1.5-fold) in each Ad-FLAG-HIC1 sample (Fig. 2A) as confirmed by qRT-PCR (Fig. 2B). Although clearly a target gene in fibroblasts (10, 11, 13), *SIRT1* may not be an universal HIC1 target (21). Indeed, a recent study has failed to detect any correlation between the *SIRT1* mRNA levels and the HIC1 status in diffuse large B-cell lymphomas showing either wild-type HIC1 expression (8 tumors) or complete HIC1 inactivation (10 tumors) (31). In two animal models of medulloblastoma, *SIRT1* mRNA levels from *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} tumors and *Ptch1*^{+/-} tumors were similar to normal age-matched cerebellum. Moreover, in the D245 medulloblastoma cell line infected with Ad-HIC1, *SIRT1* is slightly activated (1.3-fold), whereas *ATOH1* is strongly repressed (18-fold) (21).

One would not expect the other previously described HIC1 target genes *FGF-BP1*, *ATOH1*, and *E2F1* to be found on our list of potential target genes because *FGF-BP1* is only repressed after transforming growth factor- β treatment of cell lines that can undergo smooth muscle differentiation (29) and *ATOH1* encodes a neuronally specific transcription factor. *E2F1* is a target of HIC1 in normal HSF8 fibroblasts (13). However, in transformed cell lines such as U2OS, the re-expression of HIC1 may not be sufficient to counteract the deregulation of *E2F1* expression. This is reminiscent of the lack of repression of *SIRT1* observed upon re-expression of HIC1 in medulloblastoma cell lines (21) or in U2OS (this study).

We have first focused our studies on *RDC1*, a recently orphanized G-protein-coupled receptor strongly repressed in our Ad-FLAG-HIC1-infected U2OS cells (Fig. 2). CXCR7, formerly known as RDC1, has been shown to be a second receptor, in addition to CXCR4, for the chemokine SDF-1 (stromal cell-derived factor 1)/CXCL12 (22). Although CXCR7 binds CXCL12 even in cells lacking CXCR4, CXCR7 may not function as a classical chemokine receptor, as evidenced by the absence of ligand-induced CXCR7-mediated calcium mobilization or cell migration (23, 32). In fact, recent studies in zebrafish have demonstrated that CXCR7 does not act as a signaling receptor but instead participates in chemokine-guided cell migration by ligand sequestration (33). These results however did not totally rule out the possibility that CXCR7 could induce

signal transduction as suggested by studies on tumor growth and survival.

The SDF-1/CXCR4 chemotactic pathway is a key player in the cross-talk between various tumor cells and their microenvironment. First, CXCR4 is essential for the metastatic spread of breast cancers to organs where CXCL12 is expressed (34). Second, stromal fibroblast-derived CXCL12 can stimulate survival and growth of neoplastic breast cells in a paracrine fashion and can promote tumor angiogenesis by recruiting circulating endothelial cells to the tumor microenvironment (endocrine effect) (35). Similarly, CXCR7 is by far the strongest cellular gene induced during transformation of dermal microvascular endothelial cells by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, and upon ectopic expression of CXCR7, NIH3T3 become tumorigenic in nude mice (36). CXCR7 is highly expressed in human primary breast and lung tumors, and it is expressed in both malignant cells and in the tumor-associated vasculature but not in normal blood vessels (25). Finally, inhibition of CXCR7 by various strategies such as small interfering RNA interference, specific high affinity small molecule antagonist, or intrakines severely reduces proliferation of carcinoma cells *in vitro* (37) as well as *in vivo* tumor growth in animal models (32). Taken together, these results demonstrate that CXCR7 has key functions in promoting tumor development and progression through specific pathways and mechanisms that still remain to be elucidated. In addition, quantitative histologic analyses confirmed that CXCR7 expression increases with increasing tumor grade of prostate tumors (24). Reciprocally, HIC1 is hypermethylated in prostate tumors, and hypermethylation of one HIC1 allele is even already observed in histologically normal prostate and in benign hyperplastic tissues (38, 39). Our results showing that CXCR7 is a direct target of HIC1 could tie together these two sets of data.

In conclusion, we have identified the scavenger chemokine receptor CXCR7 as an additional *bona fide* HIC1 target gene. Our results demonstrate that HIC1 is a direct repressor of the CXCR7 gene and suggest that in tumors with loss of HIC1 expression the resulting increase in CXCR7 expression could participate in tumor progression.

REFERENCES

1. Makos, M., Nelkin, B. D., Reiter, R. E., Gnarna, J. R., Brooks, J., Isaacs, W., Linehan, M., and Baylin, S. B. (1993) *Cancer Res.* **53**, 2719–2722
2. Wales, M. M., Biel, M. A., el Deiry, W., Nelkin, B. D., Issa, J. P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., and Baylin, S. B. (1995) *Nat. Med.* **1**, 570–577
3. Rood, B. R., Zhang, H., Weitman, D. M., and Cogen, P. H. (2002) *Cancer Res.* **62**, 3794–3797
4. Fleuriel, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 26–33
5. Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B. R., Guérardel, C., and Leprince, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38313–38324
6. Deltour, S., Pinte, S., Guérardel, C., Wasylyk, B., and Leprince, D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4890–4901
7. Deltour, S., Guérardel, C., and Leprince, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14831–14836
8. Guérardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A. K., and Leprince, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3078–3089
9. Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T. J., Tschan, M. P., Hügli, B., Reddy, V. A., Andres, A. C., Torbett, B. E., Tobler, A., and Fey, M. F. (2006) *Oncogene* **25**, 2030–2039
10. Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S. B.

HIC1 Regulates CXCR7

- (2005) *Cell* **123**, 437–448
11. Zhang, Q., Wang, S. Y., Fleuriel, C., Leprince, D., Rocheleau, J. V., Piston, D. W., and Goodman, R. H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 829–833
 12. Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2661–2675
 13. Zhang, B., Chambers, K. J., Leprince, D., Faller, D. V., and Wang, S. (2009) *Oncogene* **28**, 651–661
 14. Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W. D., and Chen, J. (2006) *Nat. Cell Biol.* **8**, 1025–1031
 15. Kwon, H. S., and Ott, M. (2008) *Trends Biochem. Sci.* **33**, 517–525
 16. Chen, W. Y., Zeng, X., Carter, M. G., Morrell, C. N., Chiu Yen, R. W., Esteller, M., Watkins, D. N., Herman, J. G., Mankowski, J. L., and Baylin, S. B. (2003) *Nat. Genet.* **33**, 197–202
 17. Makos, M., Nelkin, B. D., Lerman, M. I., Latif, F., Zbar, B., and Baylin, S. B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1929–1933
 18. Bernard, D., Gosselin, K., Monte, D., Vercamer, C., Bouali, F., Pourtier, A., Vandebunder, B., and Abbadie, C. (2004) *Cancer Res.* **64**, 472–481
 19. Britschgi, C., Jenal, M., Rizzi, M., Mueller, B. U., Torbett, B. E., Andres, A. C., Tobler, A., Fey, M. F., and Tschan, M. P. (2008) *Br. J. Haematol.* **141**, 179–187
 20. Pinte, S., Guérardel, C., Deltour-Balardi, S., Godwin, A. K., and Leprince, D. (2004) *Oncogene* **23**, 4023–4031
 21. Briggs, K. J., Corcoran-Schwartz, I. M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W. L., Baylin, S. B., Eberhart, C. G., and Watkins, D. N. (2008) *Genes Dev.* **22**, 770–785
 22. Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moeppe, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 35760–35766
 23. Thelen, M., and Thelen, S. (2008) *J. Neuroimmunol.* **198**, 9–13
 24. Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R. S. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 4283–4294
 25. Miao, Z., Luker, K. E., Summers, B. C., Berahovich, R., Bhojani, M. S., Rehemtulla, A., Kleer, C. G., Essner, J. J., Nasevicius, A., Luker, G. D., Howard, M. C., and Schall, T. J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 15735–15740
 26. Chen, W., Cooper, T. K., Zahnow, C. A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J. E., Gokgoz, N., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Levine, A. J., Mankowski, J. L., and Baylin, S. B. (2004) *Cancer Cell* **6**, 387–398
 27. Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001) *Cell* **107**, 149–159
 28. Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. (2002) *EMBO J.* **21**, 2383–2396
 29. Briones, V. R., Chen, S., Riegel, A. T., and Lechleider, R. J. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 595–601
 30. Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., and Baylin, S. B. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 413–419
 31. Stöcklein, H., Smardova, J., Macak, J., Katzenberger, T., Höller, S., Wesendorf, S., Hutter, G., Dreyling, M., Haralambieva, E., Mäder, U., Müller-Hermelink, H. K., Rosenwald, A., Ott, G., and Kalla, J. (2008) *Oncogene* **27**, 2613–2625
 32. Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., and Schall, T. J. (2006) *J. Exp. Med.* **203**, 2201–2213
 33. Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008) *Cell* **132**, 463–473
 34. Smith, M. C., Luker, K. E., Garbow, J. R., Prior, J. L., Jackson, E., Piwnicka-Worms, D., and Luker, G. D. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8604–8612
 35. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005) *Cell* **121**, 335–348
 36. Raggio, C., Ruhl, R., McAllister, S., Koon, H., Dezube, B. J., Früh, K., and Moses, A. V. (2005) *Cancer Res.* **65**, 5084–5095
 37. Meijer, J., Ogink, J., and Roos, E. (2008) *Br. J. Cancer* **99**, 1493–1501
 38. Morton, R. A., Jr., Watkins, J. J., Bova, G. S., Wales, M. M., Baylin, S. B., and Isaacs, W. B. (1996) *J. Urol.* **156**, 512–516
 39. Li, L. C., Okino, S. T., and Dahiyi, R. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1704**, 87–102
 40. Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., and Vorbürger, S. A., Tobler, A., Leprince, D., Fey, M. F., Helin, K., and Tschan, M. P. (2009) *Mol. Cancer Res.*, in press

Table S1: Primers used in this study to construct the various deletion mutants of the promoter. F stands for forward primers and R for reverse primers. The relevant restriction sites used for subcloning in the pGL3-basic vector are shown in bold.

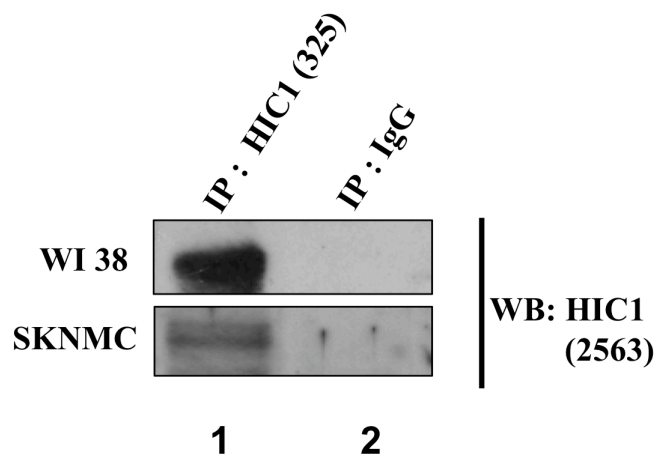
Gene	Primers	Sequence	Construct
CXCR7	F766	CGTT GGT ACC GGG AT GGG CT GGC GGGTGGC	
CXCR7	R767	CGTT TCTCG AGGCT GGG CT GGC T GGG CTGGC	-813/+168
CXCR7	F838	GGATCC GGT ACCTTAACAAGGAAAACCCAGGC	
CXCR7	R839	CGCAGG CTCG AGGGCT GGC T GGG CT GGC TGGG	-386/+164
CXCR7	F921	GGATCC GGT ACCTTTGTCTTTGGCTGACG	
CXCR7	R839	CGCAGG CTCG AGGGCT GGC T GGG CT GGC TGGG	-191/+164
CXCR7	F920	GGATCC GGT ACCTGGGATGGGGGTGGCACG	
CXCR7	R839	CGCAGG CTCG AGGGCT GGC T GGG CT GGC TGGG	-26/+164

Table S2: Primers used in this study for qRT-PCR. F stands for forward primers and R for reverse primers.

Gene	Species	Primers	Sequence
SIRT1	Human	F864	GCGGGAATCCAAAGGATAAT
SIRT1	Human	R865	CACCTAGGACATCGAGGAACTACC
CXCR7	Human	F814	CACAGCACAGCCAGGAAGG
CXCR7	Human	R815	GTTCCCTGGCTCTGAGTAGTCGA
GAPDH	Human	F842	AAGGTGGTGAAGCAGGCGT
GAPDH	Human	R843	GAGGTCCACCACCCTGTTGC
Actin	Human	F840	GCATCCTCACCTGAAGTA
Actin	Human	R841	CAGAGGCGTACAGGGATAG

Table S3: Primers used in this study for ChIP and ChIP upon ChIP experiments. F stands for forward primers and R for reverse primers. The length of the corresponding amplified PCR product is indicated.

Gene	Primers	Sequence	Length (bp)
SIRT1	F774	GATAGAAACGCTGTGCTCCA	
SIRT1	R775	CCTTCCTTTCTAGCGTGAGC	293
CXCR7	F897	GAAGAGGCATTACAGGAGC	
CXCR7	R896	CAGAAAGGAGCCTCTAGC	348
GAPDH	R847	TCCTCCTGTTTCATCCAAGC	
GAPDH	F848	TAGTAGCCGGGCCCTACTTT	218



**Fleuriel, Rood, Touka, Pinte et al.,
Supplementary Figure 1**

CLUSTAL alignments of the 5' Promoter sequences and first non-coding exons of *CXCR7*

```

Mo      AGCAGAGTGACCACCAGCCCTTTGGAGGGTGGGGGGCACTTGGGGAGGC GTTACAGTGGC 60
Rat     AGCAGAGTGACCAGCCAGCTCTT-GGAGGGTGGGGGGCACTTGGGGAGGC GTTGCAGTGC 59
Chimp   -CCAGAGCATTGCACATGGGATGGGCTGGCGGGTGGCCTTTGGGTCCCTATCTTATGGAC 59
Hu      -----GGATGGGCTGGCGGGTGGCCTTTGGGTCCCTATCTTATGGAC 42
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HiRE    1
Mo      GCGGCTTTAAAAGTAAA-GATTGGG--TCATTTTGTGCTTGTAGTTTACTAAATGGGGAA 117
Rat     A--GTTTTAAAAGTAAAAGATTGGG--TCATTTT-----ACTAAGTGA GGCA 102
Chimp   G-ATTTTTGTAATGG GGCA TTGGAGATGAGTCT-----CACCTGGATCACATT 107
Hu      G-ATTTTTGTAATGG GGCA TTGGAGATGAGTAT-----CACCTGGATCACATT 90
Cons    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mo      TTGCAAGAGACACATTTAAAAAACAACAGGGAATCTTAGCAATGTGCATCGCGATTAG 177
Rat     TTGCAAGGGACACTTTTTA-----CAGGGAATCTGAACAATGAGCATCTTGATTAG 153
Chimp   TTTAGGTTGAATTCTCCGTG-----GGGGAACTTTAGCAATACGCATCCAAATAAG 160
Hu      TTTAGGTTGAATTCTCCGTG-----GGGGAACTTTAGCAATACGCATCCAAATAAG 143
Cons    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HiRE    2
Mo      AATGTAGATTTTGATAAAGATGAGGACTGCGATAAAAAGTTGGCTAAGCTCACAATGACGA 237
Rat     AATGTAGATTTTGATAAAGATGACGATAGCGAGAAAAGTCGGCTAAGCTCACCATGACGA 213
Chimp   AATGTAGATTGCAATAATTGTAGTAA-----AGTGTT TGCC AGACTCATC-TCAGAA 211
Hu      AATGTAGATTGCAATAATTGTAGTAA-----AGTGTT TGCC AGACTCATC-TCAGAA 194
Cons    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HiRE    3 IV 5
Mo      CT-----CTACCTCACCTGCGACAAGGCCCTTTTCA-GTGACT GGCA CTGCTCGA-CT 287
Rat     TAAAGGGCTGTACTTCTCACCTGCGTCAAGACCTTTTCA-GCGACT GGCA TTGCTCAG-CC 271
Chimp   AAAGACATTATCAAAA GGCA TTTATTATCTTCTTAATGCGTGTCT GGCA CTG GGCA GACA 271
Hu      AAAGACATTATCAAAA GGCA TTTATTATCTTCTTAATGCGTGTCT GGCA CTG GGCA GACA 254
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mo      CCGTGGAACACGGTCTT-AATAGGGCCTTAAGGACTTTGTG-TAAGAGTTCCA-GCAGA- 343
Rat     CTGTAGAACCGGGTCTT-ACTAGGGACTCAAGGACTTTGTG-TAAGAGTTCCCT-ACAGA- 327
Chimp   CTGTAGAATACTATCTTGATTAGAGTCTCAAGGATTTTGTACTTAAAGTCCTTCACAAAT 331
Hu      CTGTAGAATACTATCTTGATTAGAGTCTCAAGGATTTTGTACTTAAAGTCCTTTACAAAT 314
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mo      -----ATCTGGATCCAACCTA-----AA GGCA CTTTCCCTCACTTCTGGGTGATGGCGG 392
Rat     -----ATC-----CAACCTA-----AA GGCA CTTTC-----TGGGTGATGGCCG 361
Chimp   AAAAAATATTCAAGTATAATCTATTATAAAGACTCTTTTCTCCACTTTGGGGATATA-CGG 390
Hu      AAAAGTATTCAAGTATAATCTATTATAAAGACTCTTTTCTCCACTTTGGGGATATA-CGG 373
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HiRE    6
Mo      TACAGGGTCGATTAATCGTCCCCTTTCCAAAATGTGACTTCTGTCCAGGA GGCA TCGACA 452
Rat     TACAGGGTGGATTAATCGTTCCTGTCCAAAATGTGAGTCTGTGTCCAGGA GGCA TCGACA 421
Chimp   TGTGGTATCGATTCAATGGTCA-TACCAAAACGTGTTACTTCTGTTTTGGAGGAATTAACA 449
Hu      TGT GGCA TCGATTCAATGGTCA-TACCAAAACGTGTTACTTCTGTTTTGGAGGAATTAACA 432
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Mo      AAGAAAAGCAAGCTTGACAAACCAACATCGAAGTTCAGAAGTTCAGAGTAATTTGTCTT 512
Rat     AAGAAAAGAGTAAGCTTGACAAATCAACAGCGAAGTTCAAAAGTTCAGAGTAATTTGTCTT 481
Chimp   AGGAAAACCCAGGCTTAGTAAATCAACATCGAAGTTCAGAAGTTCAGAGTAATTTGTCTT 509
Hu      AGGAAAACCCAGGCTTAGTAAATCAACATCGAAGTTCAGAAGTTCAGAGTAATTTGTCTT 492
Cons    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HiRE    VII
Mo      GGGAACAAAGTCTTCCCTGAAGCTAC-A GGCA TTCAAAGGAAC TCCCGGTGCTCATGGGA 571
Rat     GGGAACAAAGTCTTCCCTGAAGCTAC-A GGCA TTCAAAGGAAC TCCCTGGTACTCCTGGGA 540
Chimp   GGGAACAAAGTCTTCCCTAGAGCGAAGA GGCA TTCACAGGAGCTCTTGGTGTAAATGGGA 569
Hu      GGGAACAAAGTCTTCCCTAGAGCGAAGA GGCA TTCACAGGAGCTCTTGGTGTAAATGGGA 552
Cons    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

8

HiRE
Mo TTATTTAAAAGCTATACCTGAGACTGGATCAATATTTCTATCATTGGAACGTCCTAGGAC 631
Rat TTATTTAAA-GCTATACCTGAGACAGGATCAATATTTGATCATTGGAAGTACTAGGAC 599
Chimp TTATTTCAA-GATATACCTGAGACCAGATAAAATTTGATGATTTGGCAAGCACTAGGGT 628
Hu TTATTTCAA-GATATACCTGAGACCAGATAAAATTTGATGATTTGGCAAGCACTAGGGT 611
Cons ***** ** * ***** ** * ***** * * *****

Mo TTCTTT-TGGTTTTTCTCTGCTGACATTTCCCCCA-ATAGGATCTAGCCTTTGC----- 684
Rat TTCTTT-TGGTTTTTCTCTGCTGAGGGCAATTTCCCCCA-ATAGGATCTAGCCTTTGC----- 652
Chimp TTCTTTGCAGTTTTTCTCTCGGCTGACGTTTTCCCCC-GTGGGGTTTGGACTTTGTGGCTT 687
Hu TTCTTTGCAGTTTGTCTTTGGCTGACGTTTTCCCCCGTGGGGTTTGGACTTTGTGGCTT 671
Cons ***** *

Mo -----AAAGGGAGGGATCTGAGGGCTCCCAAGAATGTGTTGTGTCAGGAAA 730
Rat -----AAAGGAAGGGTTTGGAGGGCTCCCAAGAAATGTGCTGTGTCAGGAAA 698
Chimp CACCAGATTTTGCAAATGAAAGAAGGCTGGGGTTTCCCAAGAGTACACTTGTGTCAGGAAA 747
Hu CACCAGATTTTGCAAATGAAAGAAGGCTGGGGTTTCCCAAGAGTACACTTGTGTCAGGAAA 731
Cons ** *

Mo CAACAACCTAGAGAGGGTTACAGGAGGG-CGTGTGCGCCTGTACAAGCCTGCATG----- 784
Rat CAACAACCTAGAGAGGGTTACGGGAGGG-CGTGTACCGGTGTACAAGCCTGCGTG----- 752
Chimp CAACAGACTAGTGAGGTTTACAAGAGGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 807
Hu CAACAGACTAGTGAGGTTTACAAGAGGGGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 779
Cons ***** *

HiRE IX 10 TSS XI
Mo -CCGCGCGCTGTGGTGGGAGAGGAGGGCGGGAGGAG-AGCCGAGGGTTGCAAAACATGTC 842
Rat -CCGGCGC--TGTGGTGGGGGGGGGGGGGGAGGAGGAGGAGATGAGGGTTGCAAAACATGTC 809
Chimp GCCATGCCCTG-TGGGATGGGGGTGGCAAGGGGGAGAGAG-AGATGTGGGTACAAAGCTGTC 865
Hu --CTGCCCTG-TGGGATGGGGGTGGCAAGGGGGAGAGAG-AGATGTGGGTACAAAGCTGTC 835
Cons *

Mo CACCTAGAGGCA-----CTTCCCGCAGTGTATATAAAAAGGCAAGTCCGGAGCCCTGA 895
Rat CACCTAGAGGCA-----CTTCCCGCAGTGTATATAAAAAGGCAAGTCCGGAGCCCGGA 862
Chimp CATCTAGAGGCTAGAGGCTCCTTTCTGCACTGTATATAAT--GCAAGTCTGCAGCCAGCA 923
Hu CATCTAGAGGCTAGAGGCTCCTTTCTGCACTGTATATAAT--GCAAGTCTGCAGCCAGCA 893
Cons ** ***** *

Mo GAGATCTCAGTTGCTACAAACTGCTCAGCACTGAAGGAGCCTGCAGCGCTCACCGTCAGG 955
Rat GAGAACTCAGTTGCTACAAACTGCTCAGCACTGAAGGAGCCTGCAGCACTCAAAGCCAGG 922
Chimp GAGCTCACAGTTGTTGCAAAGTGTCTCAGCACTAAGGGAGCCAGCGCACAGCACAGCCAGG 983
Hu GAGCTCACAGTTGTTGCAAAGTGTCTCAGCACTAAGGGAGCCAGCGCACAGCACAGCCAGG 953
Cons *** * ***** *

Mo AAGGCAAAACCA-----CAGCCAGGAAGCCCT GAGgt 987
Rat AAGGCAAAATCA-----CAGCCAGGCAGCCGC-----GAGgt 954
Chimp AAGGCGAGCGAGCCCAGCCAGCCAGCCAGCCCG GAGgt 1022
Hu AAGGCGAGCGAGCCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCCCGGAGgt 1001
Cons ***** *

Fleuriel, Rood, Touka, Pinte et al., Supplementary Figure 2

Legends to Supplementary Figures

Supplementary Figure S1. Detection of endogenous HIC1 proteins in the Ewings/PNET cell line, SK-N-MC.

Total lysates from SK-N-MC were immunoprecipitated using the polyclonal anti HIC1 (325) antibody (lane 1) or with normal rabbit IgG (lane 2). These samples were separated by SDS/PAGE electrophoresis followed by Western blot analyses using another polyclonal anti HIC1 (2563) antibody (bottom panel). As a positive control, a similar experiment was performed with a lysate of normal human WI38 fibroblasts known to express HIC1 (10) (top panel).

Supplementary Figure S2. CLUSTAL alignments of the *CXCR7* promoter regions.

The genomic sequences for the human (NC_000002), *Pan troglodytes* (NW_006470), rat (NW_047817) and *Mus musculus* (NC_000067) *CXCR7* genes were extracted from GenBank. These sequences were anchored on the conserved splice donor site (gt) at the 3' end of the first non-coding exon and aligned using CLUSTAL/Jalview (EMBL) and default parameters. In the consensus lane (**Cons**), identical residues are shown as *, conserved substitutions as : and semi-conserved substitutions as . under the aligned sequences. The output file was subsequently edited manually. Putative HIC1 responsive elements (HiRE) (5) are indicated in bold letters with the GGCA (or TGCC) core motif highlighted. The sites found in the human sequence and analyzed by transient transfection assays are numbered from 1 to 11. Those conserved in the primate and rodent genomes are numbered using roman numerals. The Transcription start site (TSS) defined for the human gene (NM_020311; gi 114155149) is highlighted in grey.

Résultats complémentaires

Des expériences de double immunoprécipitation de chromatine (ChIP-reChIP) ont été mises en place afin d'étudier le recrutement par HIC1 de MTA1 et CtBP sur la région englobant le site HiRE XI, qui a été montré jouant un rôle essentiel dans la régulation du promoteur de *CXCR7* par HIC1. Ceci a permis de mettre en évidence la régulation de ce gène selon l'état de croissance des fibroblastes primaires WI38. En effet, lorsque les cellules sont quiescentes, c'est-à-dire lorsqu'elles ont été privées de sérum pendant 72h, les complexes HIC1-MTA1 et HIC1-CtBP ne sont pas présents au promoteur de *CXCR7*. Par contre, lorsque ces cellules sont en prolifération en fin de phase G1, c'est-à-dire après privation de sérum puis remise en présence durant 10h, HIC1 recrute les complexes NuRD et CtBP au promoteur de ce gène, laissant supposer une répression transcriptionnelle active. Enfin, ce gène est également finement régulé lors de l'arrêt de croissance par sénescence répllicative, puisque, dans ces conditions, MTA1 est recrutée par HIC1 à son promoteur.

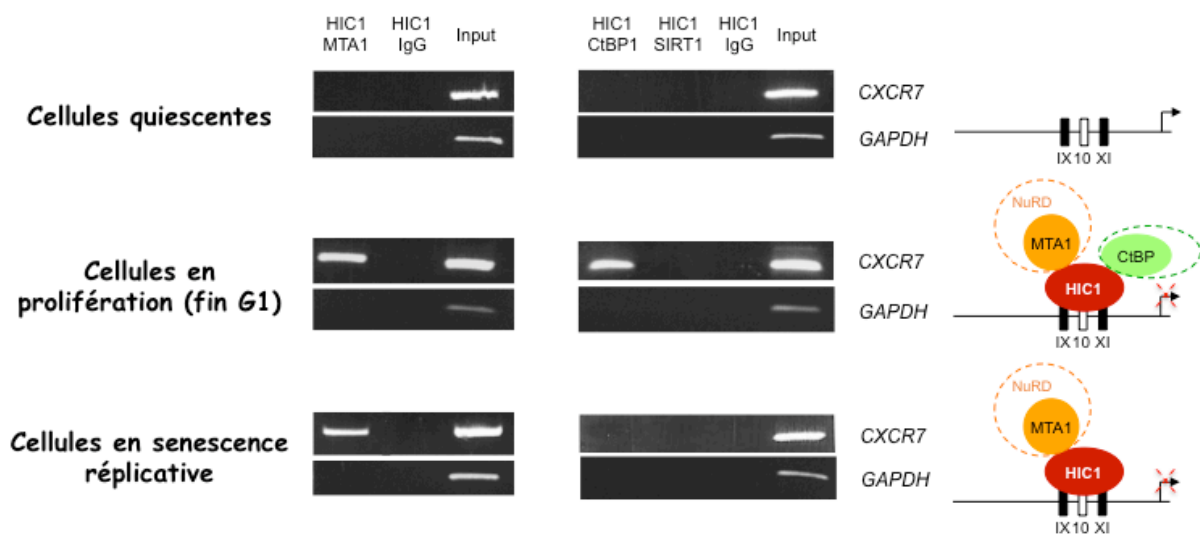


Figure 46 : Recrutement des complexes NuRD et CtBP au promoteur de *CXCR7* en fonction de l'état de croissance des fibroblastes humains primaires WI38.

V. Etude de l'interaction entre HIC1 et les protéines BCL11

A. Validation de l'interaction entre HIC1, BCL11A et BCL11B

Les clones codants les protéines BCL11 nous ont initialement été fournis par PW Tucker (The University of Texas, Austin USA), c'est pour cette raison que nous utilisons cette terminologie pour désigner ces protéines.

Le crible double hybride, effectué avec la chimère BTB-RC-G4(DBD), a permis d'isoler la partie C-terminale de BCL11AXL contenant les doigts de zinc 5 et 6 entiers ainsi qu'une partie tronquée du doigt de zinc 7. Cette région étant fortement conservée entre BCL11A et BCL11B, il apparaissait fort probable que HIC1 puisse interagir avec les deux paralogues, BCL11A et BCL11B.

```
XL-BCL11A      SKRIKLEKEFDLPPATMPNTENVYSQWLAGYAASR-QLKDPFLSPGDSRQSPFASSEHS 691
Y2H
BCL11 B       AKRIKVEKDLELPPAALI PSENVYSQWLVGYAASRRHFMKDPFLGPTDARQSPFATSSEHS 673
:***:***:~:***:~ :***** ,***** :***** * *:*****:*****

XL-BCL11A      SENGSLRFSTPPGE-LDGGISGRSGTSGGGSTPHISGPGTGRPSSKEGRSRTCYCEYCGKV 750
Y2H
BCL11 B       SENGSLRFSTPPGDLLDGGLSGRSGTASGGSTPHLGPGPGRPPSSKEGRSRTCYCEYCGKV 733
*****:~:***:***** ,***** ;~*~*****

XL-BCL11A      FKNCNLTVHRRSHTGERPYRCELCNYACAQSSKLRHMKTHGQVGKDVYKCEIQMPFS 810
Y2H
BCL11 B       FKNCNLTVHRRSHTGERPYRCELCNYACAQSSKLRHMKTHGQIQKEVYRCDIQMPFS 793
*****:~:***:***** ,***** ;~*~*****

XL-BCL11A      VYSTLEKHMKKMHEDRVLNNDIKTE 835
Y2H
BCL11 B       VYSTLEKHMKKMHGEHLLTNDVKIEQAERS 823
*****:~:~:~*~*~*
```

Figure 47 : Alignement des séquences protéiques de BCL11AXL et BCL11B. En jaune est représentée la partie isolée en double hybride et en gris les doigts de zinc 5, 6 et 7.

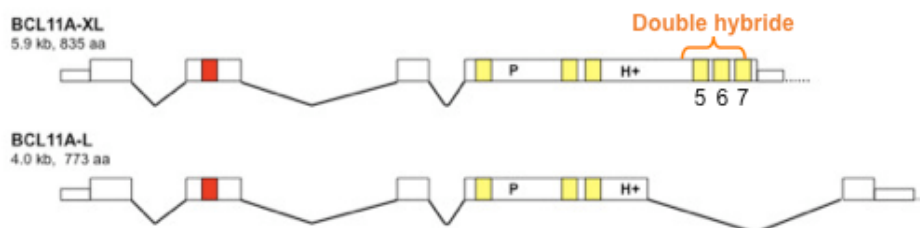


Figure 48 : Représentation des formes XL et L de BCL11A (Liu et al., 2006a), et de la partie isolée en double hybride avec la chimère BTB-RC-G4(DBD).

Ces interactions ont tout d'abord été validées en surexpression après transfection transitoire en cellules HEK293T. Elles sont représentées sur la figure suivante.

HIC1 interagit donc avec BCL11AXL, et de manière moins importante avec la forme L de cette protéine, ce qui suggère l'existence d'autres domaines d'interaction puisque la forme L est dépourvue des doigts de zinc 5-6-7. De même, HIC1 interagit avec BCL11B.

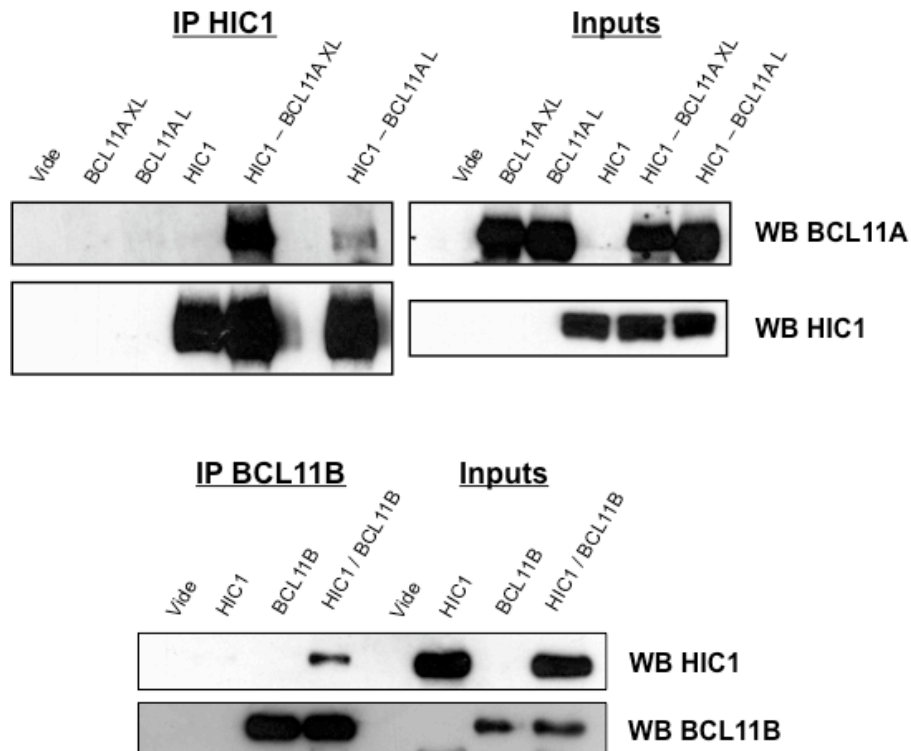


Figure 49 : Validation de l'interaction entre HIC1 et BCL11AXL, L et BCL11B en CoIP après surexpression en cellules HEK293T.

Ces interactions ont également été confirmées entre les protéines endogènes dans deux types cellulaires différents qui expriment HIC1 ; la lignée de médulloblastome Daoy exprimant BCL11A et la lignée dérivée d'un sarcome d'Ewing, SKNMC, exprimant BCL11B.

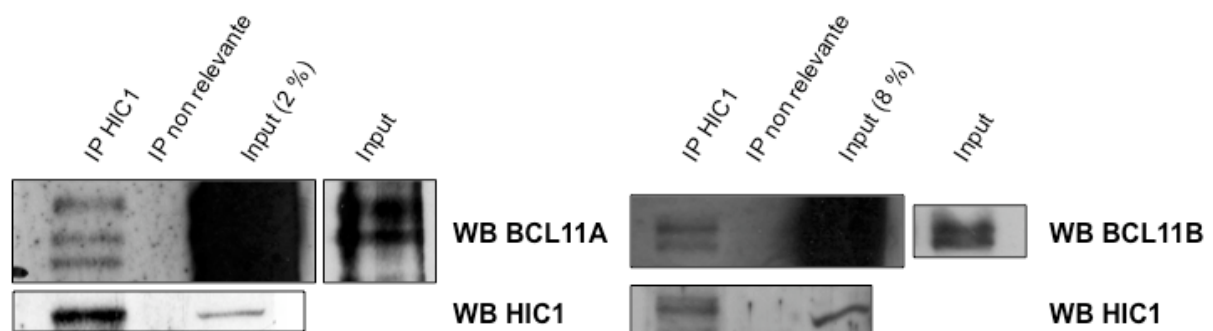


Figure 50 : Interaction endogène entre les protéines HIC1 et BCL11A dans les cellules Daoy, et entre les protéines HIC1 et BCL11B dans les cellules SKNMC. Des expositions moins longues des pistes « inputs » sont présentées à droite de chaque blot.

Les deux bandes coimmunoprécipitées par HIC1 dans les SKNMC correspondent aux deux isoformes décrites de BCL11B. Par contre, bien que celles identifiées de plus haut poids moléculaire par l'anticorps dirigé contre BCL11A puissent représenter les formes XL et L, puisque migrant aux tailles attendues, ces bandes ne sont pas formellement identifiées comme étant ces isoformes. De plus, celle de taille inférieure ne peut pas correspondre à l'isoforme S car son niveau de migration paraît trop élevé.

B. L'interaction entre HIC1 et BCL11 est complexe

Nous avons ensuite voulu déterminer par quelles régions ces protéines interagissent. Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé la technique de double hybride en cellules mammifère. Nous avons baptisé le fragment de BCL11AXL isolé en double hybride levure N+ZF5-6, puisque contenant le groupe C-terminal de doigts de zinc (avec le 7 incomplet) additionnés d'une petite partie en amont. Différents fragments ont donc été clonés en phase avec le domaine d'activation de VP16, et ce dans le but de déterminer la région précise d'interaction : la partie N, les ZF5-6 ou la région entière N+ZF5-6. Dans un premier temps, ils ont été confrontés au fragment de HIC1 utilisé dans le double hybride en levure, BTB-RC-G4(DBD). L'activité luciférase émise par un plasmide rapporteur contenant les éléments de réponse à Gal4 en amont d'un gène codant la Luciférase a été mesurée et est représentée sur la figure 51.

Ces résultats confirment tout d'abord l'interaction entre la chimère BTB-RC-G4(DBD) et la région de BCL11AXL isolée initialement, N+ZF5-6. Ce domaine entier apparaît important pour l'interaction puisque les régions N et ZF5-6 isolées présentent une interaction moindre. La région N pourrait éventuellement mieux interagir que les ZF5-6 (ce n'est cependant pas très significatif) ; elle nécessite peut être une région voisine structurée afin être correctement conformée.

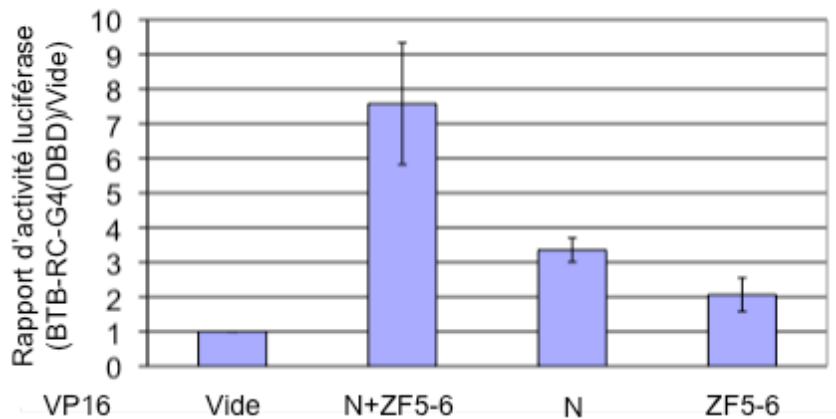


Figure 51 : Test d'activité luciférase de double hybride mammifère entre les chimères BTB-RC-G4(DBD) et N+ZF5-6, N et ZF5-6(VP16-AD).

Nous avons ensuite effectué l'expérience réciproque, c'est à dire la confrontation de différentes constructions de HIC1 à la région N+ZF5-6(VP16-AD) de BCL11AXL.

Les résultats montrent que la région centrale de HIC1 interagit avec BCL11AXL alors que le domaine BTB/POZ semble exclu. Cependant, cette région centrale n'interagit pas aussi bien que la chimère entière, ce qui une fois encore s'explique par le fait que cette région centrale prise isolément est probablement mal conformée lorsqu'elle n'est pas suivie des doigts de zinc.

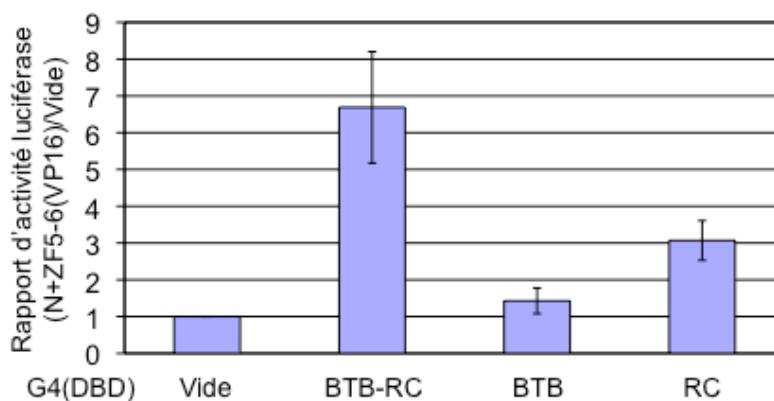


Figure 52 : Test d'activité luciférase de double hybride mammifère entre les chimères N+ZF5-6(VP16-AD) et BTB-RC-G4, BTB-G4 et G4-RC.

Ces expériences de double hybride nous permettent de conclure que la région centrale de HIC1 interagirait avec la petite partie en amont des doigts de zinc terminaux de BCL11AXL. Nous avons donc cloné cette région BCL11AXL N en phase avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et effectué un test d'activité luciférase avec le même plasmide rapporteur que décrit précédemment. Il s'avère, comme l'illustre la figure suivante, que cette région de BCL11AXL est un domaine activateur de la transcription. BCL11B est d'ailleurs décrit comme étant un activateur transcriptionnel dans le contexte du gène *IL2* au sein de cellules T (Cismasiu et al., 2006).

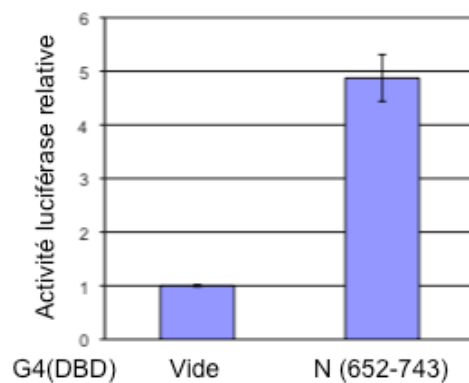


Figure 53 : Test d'activité luciférase due à BCL11AXL N (aa 652 à 743).

Les résultats obtenus grâce à la technique de double hybride mammifère en ce qui concerne la région de HIC1 interagissant avec les protéines BCL11 n'étant pas très clairs, nous avons utilisé des expériences de coimmunoprécipitation après surexpression, à l'aide de plasmide codant différentes régions de HIC1 et la protéine BCL11AXL de pleine longueur.

Les résultats, présentés sur les figures suivantes, montrent que cette interaction est complexe puisque des domaines isolés de HIC1, le domaine BTB/POZ et les doigts de zinc, sont capables d'interagir avec ce partenaire, tout comme la région utilisée en contrôle, BTB-RC.

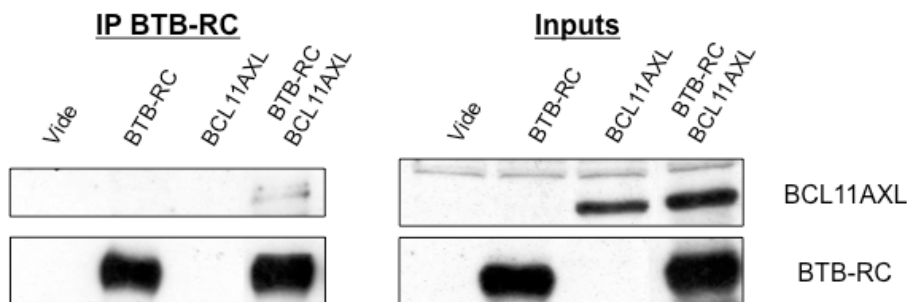


Figure 54 : La région constituée du domaine BTB/POZ et de la région centrale de HIC1 interagit avec BCL11AXL.

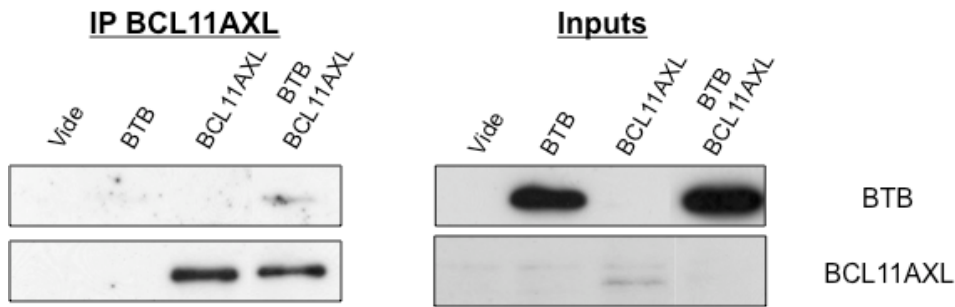


Figure 55 : Le domaine BTB/POZ isolé de HIC1 interagit avec BCL11AXL.

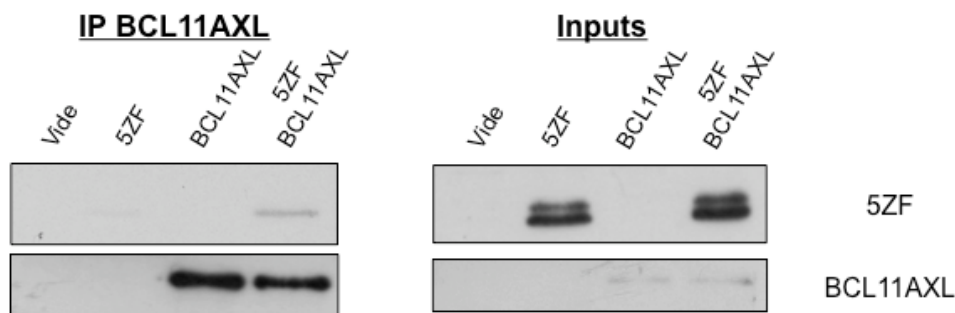


Figure 56 : Le domaine contenant les doigts de zinc de HIC1 interagit avec BCL11AXL.

C. A quoi ça sert ?

Une fois l'interaction entre HIC1 et les membres de la famille BCL11 validée, nous avons essayé de définir sa conséquence fonctionnelle. Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les fonctions de ces protéines sont variées. Elles sont décrites en tant que corépresseurs, ou comme facteurs de transcription ayant des activités de répression ou d'activation transcriptionnelle. D'autre part, BCL11A est modifiée par SUMOylation mais la fonctionnalité de cette modification n'est pas définie.

Nous avons tout d'abord testé différents mutant de HIC1 en coimmunoprécipitation, ce qui nous a permis de conclure que la liaison à l'ADN de HIC1 n'est pas nécessaire à cette interaction, et que cette interaction est indépendante de celle entre HIC1 et CtBP.

En effet, comme il est représenté sur la figure suivante, le mutant au sein du troisième doigt de zinc de HIC1, C521S, abolissant la liaison à l'ADN, interagit toujours avec BCL11AXL. Il en est de même pour le mutant délété du site d'interaction avec CtBP, Δ GLDLSKK.

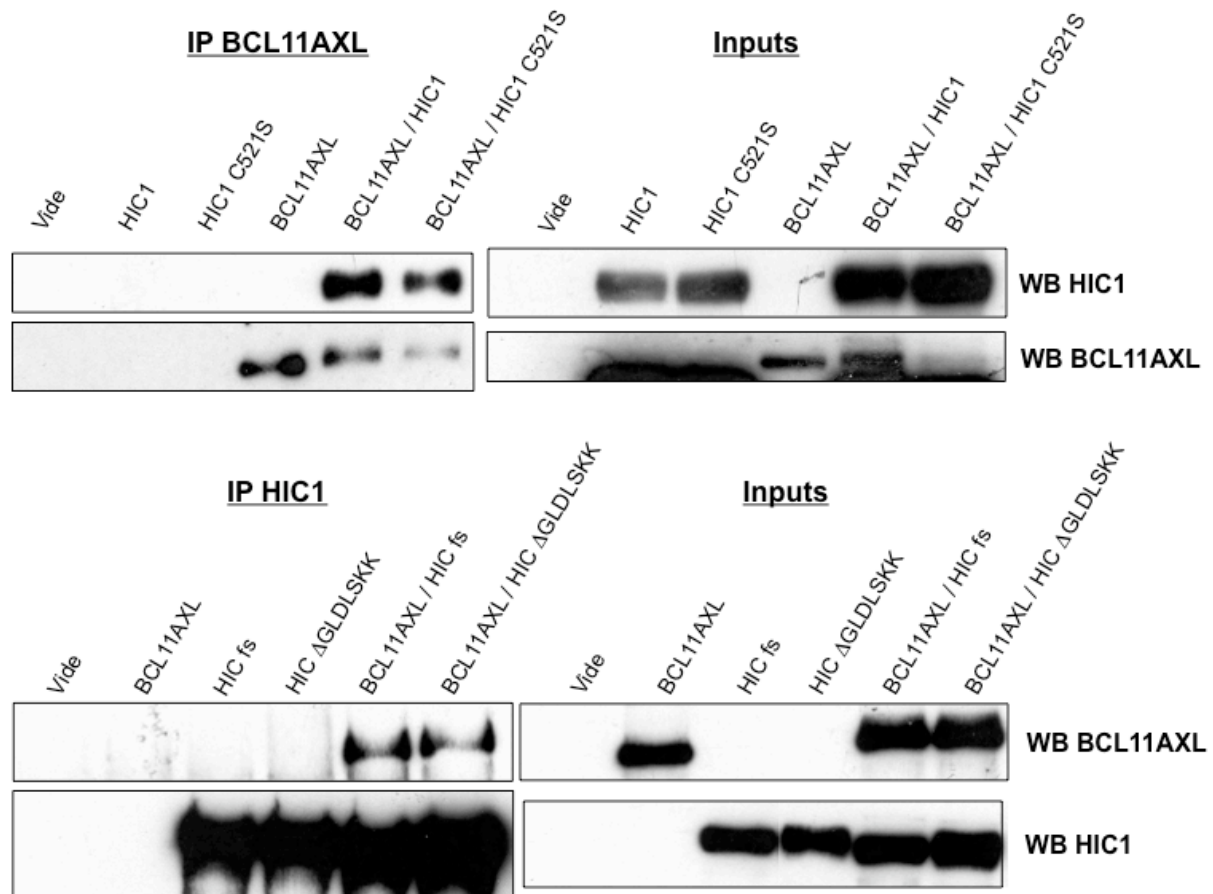


Figure 57 : La liaison à l'ADN de HIC1, ainsi que le recrutement de CtBP, ne sont pas nécessaires à l'interaction avec BCL11AXL.

Nous avons ensuite cherché, en fonction des rôles physiologiques connus des protéines BCL11, si HIC1 pouvait être impliquée dans ces mêmes rôles.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il a été décrit que BCL11B active la transcription du gène *IL2* dans des cellules CD4⁺ activées.

Dans un premier temps, nous avons donc regardé si HIC1 est exprimée dans des cellules CD4⁺ humaines activées ou non. Pour ce faire, en collaboration avec le Dr Anne Tscopoulos de l'Institut Pasteur de Lille, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation dans des cellules humaines CD4⁺ purifiées à partir de poches de sang de donneurs sains, et activées ou non par le couple PMA-Ionomycine.

Non seulement HIC1 est exprimée dans les cellules T CD4⁺, mais la quantité de cette protéine paraît plus importante dans les cellules activées. La quantité de HIC1 détectable dans des extraits protéiques directs de ces cellules étant faible, nous avons effectué une immunoprécipitation de HIC1, en utilisant le même nombre de cellules activées ou non, dans le but d'enrichir les extraits à déposer sur gel d'acrylamide. Ces résultats sont représentés ci-dessous.

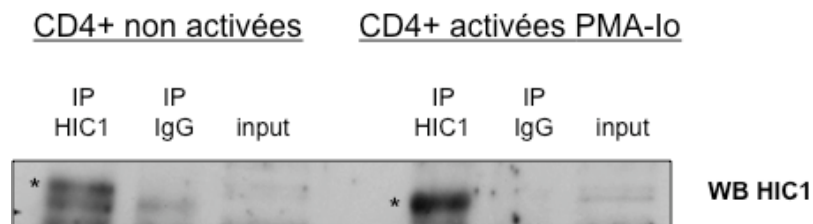


Figure 58 : Présence de HIC1 dans les cellules humaines CD4⁺ activées ou non (* niveau de migration de HIC1).

Nous avons donc étudié l'implication potentielle de HIC1 dans le mécanisme d'activation du gène codant l'Interleukine 2 (IL2) par BCL11B.

Nous avons commencé par l'implication potentielle de HIC1 dans la sécrétion d'IL2 au sein de cellules CD4⁺, activées ou non. Pour ce faire, nous avons transfecté *HIC1* par nucléofection dans la lignée cellulaire CD4⁺ humaine issue de leucémie aigüe Jurkat, cellules dans lesquelles il n'est pas exprimé. Puis, après 48h afin que les plasmides transfectés soient exprimés correctement, nous avons activé ou non ces cellules par PMA-Ionomycine, mimant l'activation par le TCR (T Cell Receptor). Nous avons ensuite prélevé le surnageant cellulaire à différents temps d'activation afin de doser l'IL2 sécrétée par ces cellules, grâce à la méthode d'ELISA.

Deux expériences indépendantes, représentées dans la partie supérieure de la figure 59, nous ont permis de mettre en évidence le fait que HIC1 potentialise la sécrétion d'IL2 au sein des cellules T, qu'elles soient activées ou non.

La partie inférieure de cette figure représente les quantités de protéines exprimées par les cellules à la fin de la première expérience d'ELISA. Les dépôts ont été effectués en duplicat. Ce western blot nous indique, d'une part, que la protéine FLAG-HIC1 (révélée grâce à un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG) est exprimée de manière plus importante au sein des cellules activées, ce qui peut être dû à un effet du couple PMA-Ionomycine sur le promoteur CMV du vecteur d'expression. D'autre part, cette expérience montre que la protéine BCL11B endogène est beaucoup moins présente après activation. Ceci n'est pas décrit dans la littérature, et nous ne pouvons conclure pour l'instant s'il s'agit d'une dégradation protéique

ou d'une répression de la transcription du gène *BCL11B*. Pour répondre à cette question il faudrait effectuer des tests complémentaires, comme l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome ou des expériences de quantification des taux d'ARNm.

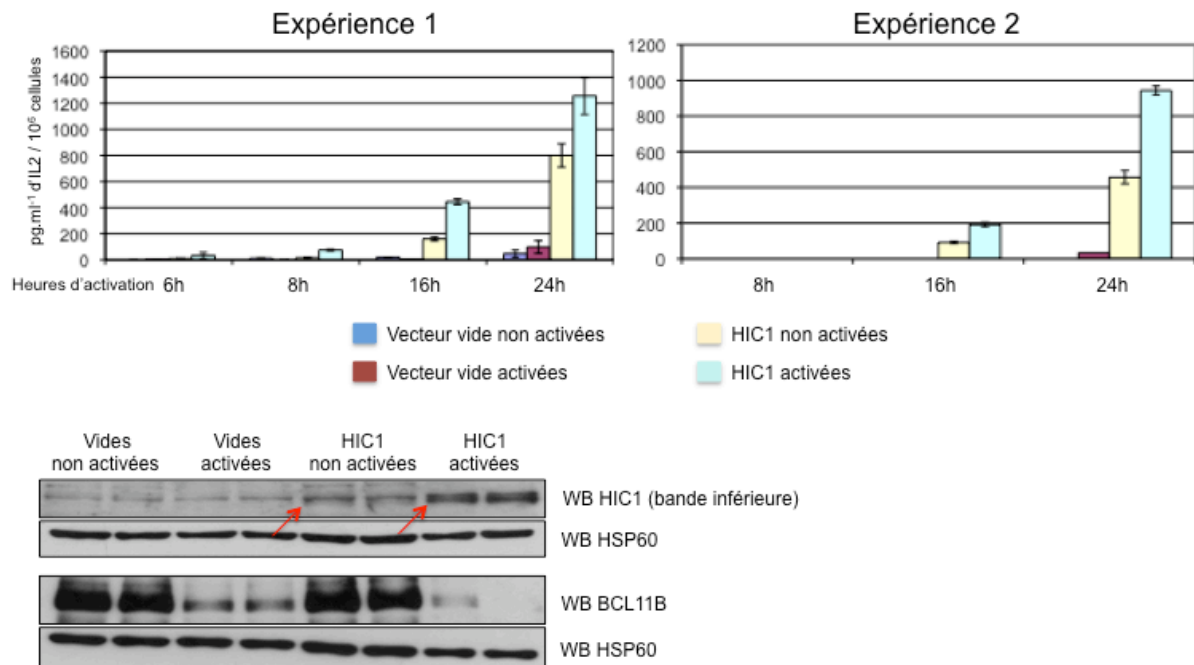


Figure 59 : Partie supérieure : deux tests ELISA indépendants : HIC1 potentialise la sécrétion de l'IL2 par des cellules T CD4⁺ Jurkat activées ou non. Partie inférieure : WB représentant les quantités de protéines HIC1 et BCL11B exprimées dans les cellules ayant servi au test ELISA n°1, après 24h d'activation.

Cette expérience ne nous indique cependant pas si l'effet de HIC1 sur la sécrétion d'IL2 est direct, ni s'il implique BCL11B. Pour ceci il est envisagé de mettre en place des expériences de ChIP sur le promoteur du gène *IL2* ainsi que des tests ELISA après transfection de shRNAs ciblant BCL11B.

Pour essayer de progresser dans la compréhension du rôle de l'interaction HIC1/BCL11B, nous avons ensuite étudié l'effet que pouvait avoir HIC1 au niveau d'un gène cible direct de BCL11B, sur lequel cette protéine est responsable d'un effet de répression de la transcription. Nous nous sommes donc intéressés à *p57KIP2*. Ce nouveau gène cible de HIC1 est décrit au sein du premier article présenté dans ce manuscrit ; cependant il avait été identifié comme gène cible de BCL11B par Topark-Ngarm et ses collaborateurs (Topark-Ngarm et al., 2006).

Au sein du promoteur de ce gène, nous avons identifié des sites potentiels de fixation pour HIC1 centrés autour d'un cœur GGCA (ou en inverse complémentaire TGCC). Un des ces sites est relativement proche, dans la séquence, de ceux identifiés pour BCL11B, GGCCGG.

```

5'CCGCCCCGCCCCGGTGGGTGTGCGCGCGGCCAATGGGCGGTGCGCGGG
GGCCGGGCCGCGGCGGGGGCGGGCAGCGGGGCGGCCGCCAATCGCCGTGG
TGTGTGTTGAAACTGAAAATACTACATTATGCTAATCGCGGCCGGGCCCGCGCGC
ACGGGGGTGGGGCCCGCGCGTATAAAAGGGGGCGCAGGCGGGCTGGGCGTTC
CACAGGCCAAGTGCCTGTGCTCGAGGGGTGCCGGCCAAGCCTGAGCGAGC
GAGCTAGCCAGCAGGCATCGAGGGGGCGCGGCTGCCGTCCGGACGAGACAG
GCGAACCCGACGCAGAAGAGTCCACCACCGGACAGCCAGGTAGC3'

```

Figure 60 : Séquence d'une partie du promoteur de *p57KIP2*. La boîte TATA est représentée en gris et soulignée, les sites de fixation de BCL11B en bleu et les sites potentiels pour HIC1 en rouge.

La présence de sites potentiels de fixation nous a incité à effectuer des expériences de ChIP afin de déterminer si HIC1 peut se lier au promoteur de *p57KIP2*. Ces expériences ont été mises en œuvre dans des cellules dérivées de sarcomes d'Ewing SKNMC, qui expriment BCL11B mais aussi HIC1. Les oligonucléotides utilisés en tant qu'amorces de PCR sont ceux publiés par Topark-Ngarm et al. en 2006. Les résultats, présentés sur la figure suivante, montrent que HIC1 se trouve au promoteur de *p57KIP2*, dans des cellules SKNMC, et ce dans la même région que BCL11B. De manière plus inattendue, ces deux protéines se trouvent également sur la région du promoteur de *SIRT1* contenant les sites distaux de HIC1.

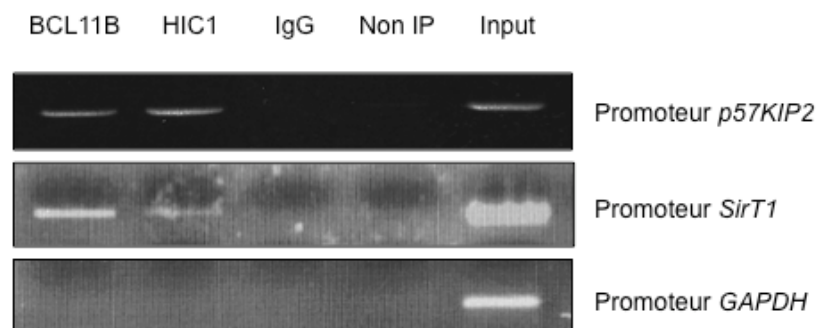


Figure 61 : Dans des cellules SKNMC, les protéines HIC1 et BCL11B se trouvent sur les mêmes régions des promoteurs de *p57KIP2* et *SIRT1*.

Cette expérience de ChIP ne démontre cependant pas un effet de HIC1 et/ou de BCL11B sur la transcription de ce gène cible. Pour ce faire, nous avons donc mis en place des expériences de test luciférase, à l'aide d'un plasmide codant la Luciférase en aval d'une séquence plus ou moins longue du promoteur de *p57KIP2* : de -165 à +90 pb ou de -595 à +90 pb.

Les résultats, présentés ci-dessous, montrent que HIC1 et BCL11B répriment la transcription du gène *Luciférase* via ce promoteur, mais que ces protéines n'ont pas d'effet d'opposition, ni additionnel, ni synergique entre elles, et ce même en présence de quantités croissantes de HIC1.

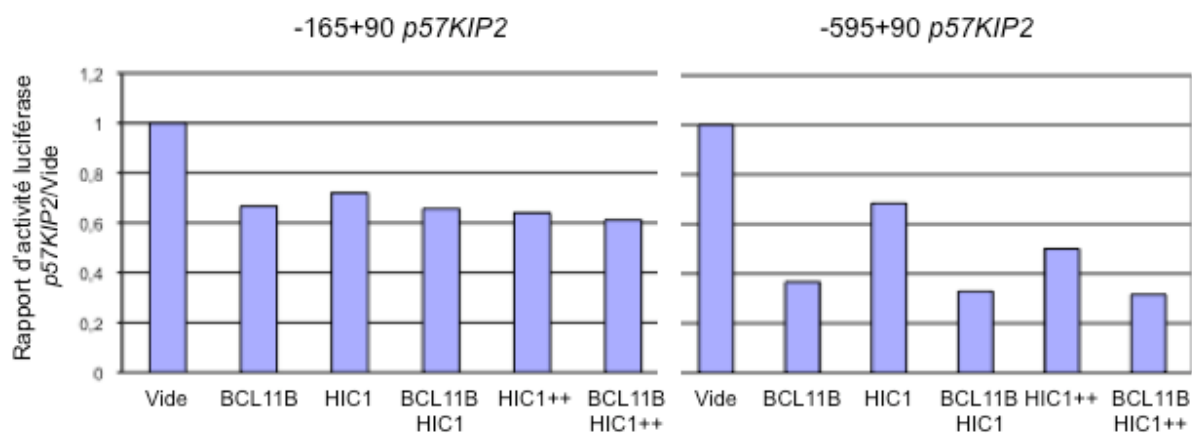


Figure 62 : HIC1 et BCL11B répriment la transcription du promoteur de *p57KIP2*, de manière supposée indépendante l'une de l'autre.

Le même type d'expériences a été effectué dans différentes conditions, menant toujours aux mêmes conclusions.

Par exemple, HIC1 n'a pas d'effet sur la répression transcriptionnelle mise en place par BCL11AXL couplée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4, sur des éléments de réponse à Gal4, présents sous le contrôle d'un promoteur minimal et en amont d'un gène codant la Luciférase.

L'expérience complémentaire, en présence des éléments de réponse à HIC1 (5xHiRE), sous le contrôle d'un promoteur minimal et en amont d'un gène codant la Luciférase, a également été mise en place, et ce afin de déterminer si BCL11B et/ou BCL11AXL pouvaient avoir un effet sur la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1. De la même manière que pour *p57KIP2*, la figure suivante montre que BCL11B et BCL11AXL n'ont pas d'effet sur la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1 dans ces conditions.

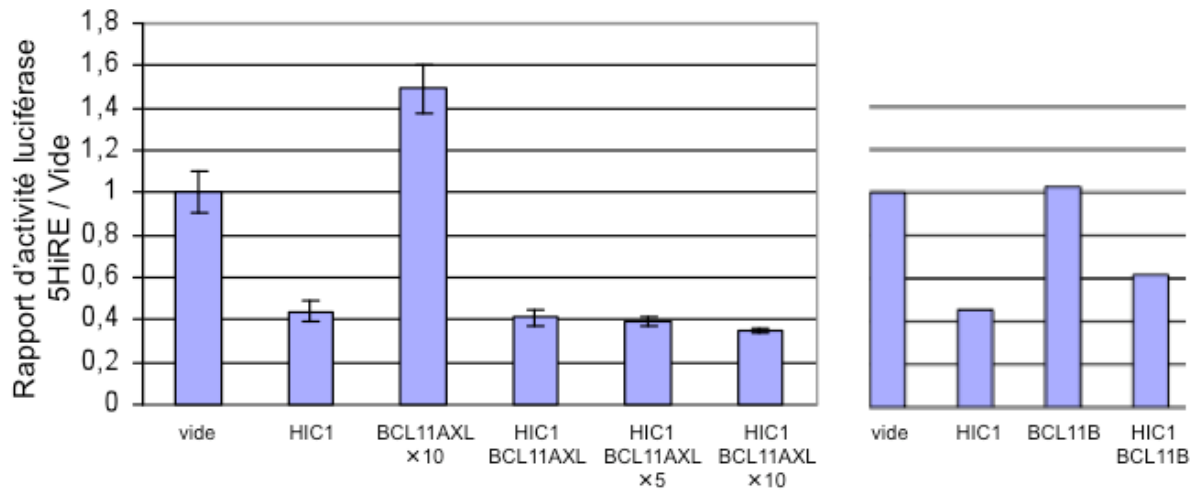


Figure 63 : Les protéines BCL11AXL (à gauche) et BCL11B (à droite) n'ont pas d'effet sur la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1 sur ses sites 5HiRE contrôlés par un promoteur minimal.

Tous ces résultats suggèrent donc que HIC1 et les protéines BCL11 puissent avoir un rôle complémentaire. Cependant, ceci ne nous explique pas à quoi sert cette interaction, ni dans quelles conditions elle a lieu.

Afin de répondre à la question de la nécessité de présence de ces protéines à l'ADN pour que l'interaction ait lieu, nous avons effectué une expérience de coimmunoprécipitation entre les protéines HIC1 et BCL11B endogènes en présence de Bromure d'Ethidium (BET), un intercalant de l'ADN qui est plus affiné pour l'ADN que les protéines. Cette technique est utilisée pour démontrer qu'une interaction entre deux facteurs de transcription est indépendante de leur fixation à l'ADN (Lai & Herr, 1992).

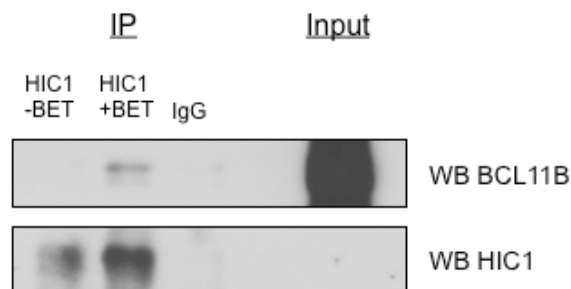


Figure 64 : L'interaction endogène en SKNMC entre HIC1 et BCL11B est plus importante en présence de BET.

Comme nous montre la figure précédente, l'interaction entre HIC1 et BCL11B semble être favorisée en présence de BET. Comme il a été décrit avec TCF4 (Valenta et al., 2007), HIC1 pourrait donc séquestrer BCL11B au sein de ses corps nucléaires.

D. Perspectives

Nous avons donc établi que les protéines HIC1 et différents membres de la famille BCL11 interagissent : BCL11B, BCL11AXL, et dans une moindre mesure BCL11AL. Le fait que HIC1 interagisse avec les deux orthologues BCL11A et BCL11B n'est pas forcément étonnant, puisque ces protéines sont très homologues et qu'elles ne sont pas exprimées au sein des mêmes types cellulaires.

Cependant, le rôle fonctionnel de cette interaction reste obscur. Dans un premier temps et au vu des résultats préliminaires obtenus, deux types d'expériences peuvent être effectuées afin d'essayer d'éclaircir ce point.

Tout d'abord, dans le cadre de l'effet de HIC1 sur la sécrétion d'IL2, il est envisageable d'effectuer le même type de test ELISA en présence d'un ARN interférant dirigé contre BCL11B. Ceci nous permettra de déterminer si l'effet de HIC1 sur la sécrétion d'IL2 nécessite la présence de ce partenaire. Nous sommes d'ores et déjà en possession d'un plasmide codant un ARN interférant qui diminue suffisamment le taux de BCL11B en cellules Jurkat après nucléofection (O Rohr).

Un deuxième type d'expérience envisageable est un ChIP-reChIP HIC1 puis BCL11B dans les cellules SKNMC afin de regarder si ces deux protéines sont présentes en même temps au promoteur de *p57KIP2*, et ainsi d'éclairer l'hypothèse d'une complémentarité de fonction.

D'autre part, nous pouvons également envisager un rôle dans le contexte de MTA1. Pour ce faire, nous pourrions cloner un gène codant une protéine BCL11 tronquée pour sa région N-terminale, domaine impliqué dans l'interaction avec le complexe NuRD via la protéine MTA1. Après vérification de l'interaction potentielle avec HIC1, nous pourrions l'utiliser en vue de tests fonctionnels dans le contexte de cette dernière.

Des expériences préliminaires de coimmunoprécipitation entre la forme de HIC1 constitutivement acétylée, HIC1K314Q, et BCL11B tendent à montrer une interaction moins forte qu'avec la forme non mutée de HIC1. Cependant c'est loin d'être aussi net que dans le

cas de l'interaction avec MTA1. Nous envisageons donc les mêmes tests de répression d'activité luciférase que ceux présentés ici, mais en présence de HIC1K314Q.

En effet, BCL11B et HIC1 pourrait interagir ensemble avec MTA1 mais via des régions différentes, entraînant une insensibilité à la régulation des interactions « individuelles » avec cette protéine, et donc coopérant au sein des mêmes fonctions, comme nous l'avons suggéré au cours des résultats.

Un autre partenaire potentiel de HIC1 a été identifié grâce au crible double hybride en levure décrit précédemment : une protéine ZnFs (Zinc-Fingers) possédant également un domaine BTB/POZ, cKrox. Cette protéine est exprimée pendant la sélection positive des cellules T et promeut leur différenciation en lignée CD4⁺ (Sun et al., 2005).

Une expérience préliminaire a été effectuée en surexpression, validant l'interaction entre cKrox et HIC1 et montrant également l'interaction de cette protéine avec BCL11B. Il reste à valider ces résultats entre les protéines endogènes. Ils suggèrent cependant fortement l'existence d'un nouveau partenaire commun à HIC1 et BCL11B.

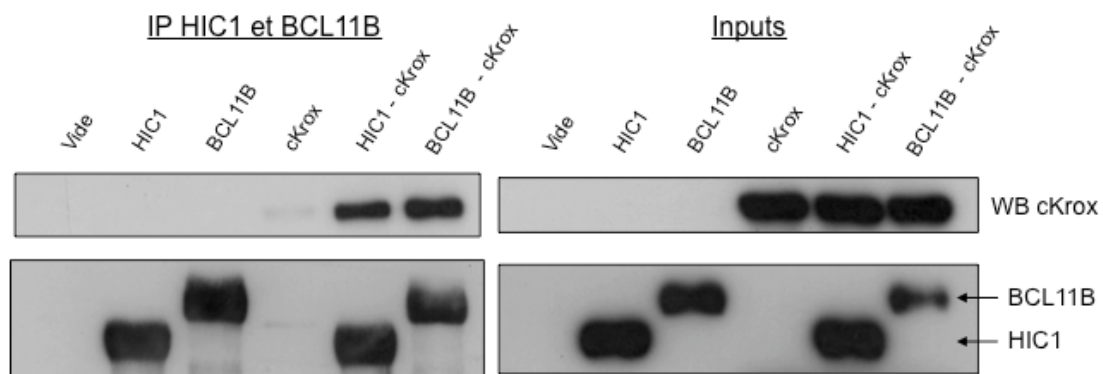


Figure 65 : Interaction entre HIC1, BCL11B et cKrox.

BCL11A interagissant également avec BCL6, ces protéines BCL11 pourrait être des partenaires « universels » des protéines à domaine BTB/POZ, tout comme KAP1 est celui des protéines à domaine KRAB (Schultz et al., 2001).

DISCUSSION

Depuis sa découverte, l'importance de l'implication de HIC1, en particulier dans la cancérisation, prend de l'ampleur de part son rôle fondamental au sein de multiples types cancéreux.

Cependant, et de manière étonnante, la connaissance de ses rôles biologiques et mécanismes d'action n'est pas encore très avancée.

En effet, par comparaison, la recherche effectuée sur l'une de ses « cousines », la protéine BCL6, appartenant également à la famille POK (POZ and Krüppel), en est à un stade beaucoup plus avancé. Cette dernière a atteint le stade d'essais d'inhibiteurs spécifiques en recherche clinique, et au niveau fondamental se dessinent des régions protéiques bien caractérisées en ce qui concerne leurs mécanismes de fonctionnement et leurs rôles biologiques associés.

Ma Thèse s'est donc inscrite dans ce contexte, et a consisté en l'étude des différents mécanismes de répression transcriptionnelle pouvant être mis en place par HIC1 sur ses gènes cibles. Au début de ce travail, aucun gène cible n'était encore caractérisé, et un seul mécanisme de répression transcriptionnelle était connu, le recrutement de CtBP. Puis le premier gène cible direct de HIC1 a été identifié par l'équipe de S Baylin, *SIRT1*, ouvrant la porte à de nouvelles expérimentations, comme par exemple l'étude du recrutement de facteurs sur une cible endogène. Depuis, quelques autres gènes cibles directs ont été identifiés, menant leur nombre à 4. La SUMOylation de HIC1 a également été caractérisée au cours de ces dernières années, au sein de notre équipe, et a constitué le travail de Thèse de Nicolas Stankovic-Valentin. Cependant, malgré la démonstration de son implication dans la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1, le mécanisme d'action sous-jacent n'avait pas été identifié.

D'une manière générale, ce travail nous a permis de caractériser un des mécanismes de répression transcriptionnelle dépendant de la SUMOylation de HIC1. Il s'agit du recrutement de la protéine MTA1, appartenant au complexe de désacétylation des histones et de remodelage des nucléosomes, NuRD. Nous avons également contribué à la caractérisation d'un type de complexe SWI/SNF recruté par HIC1, spécifiquement au niveau d'un de ses gènes cibles, impliqué dans le cycle cellulaire, *E2F1*.

De plus, nous avons caractérisé de nouveaux gènes cibles directs de HIC1, *CXCR7*, *Cycline D1* et *p57KIP2*, dont deux sont clairement impliqués dans le cycle cellulaire.

Enfin, nous avons pu montrer que la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1, sur la plupart de ses gènes cibles directs, est fonction de l'état de croissance des cellules, c'est-à-dire de l'état quiescent G0 ou de la croissance, au stade G1 tardif.

Ce recrutement différentiel de HIC1 nous a permis d'identifier un nouveau site exclusif au sein du promoteur de *SIRT1*, complexifiant encore la régulation transcriptionnelle de ce gène, déjà largement décrite.

Tous ces résultats sont représentés, de manière schématique, sur la figure suivante.

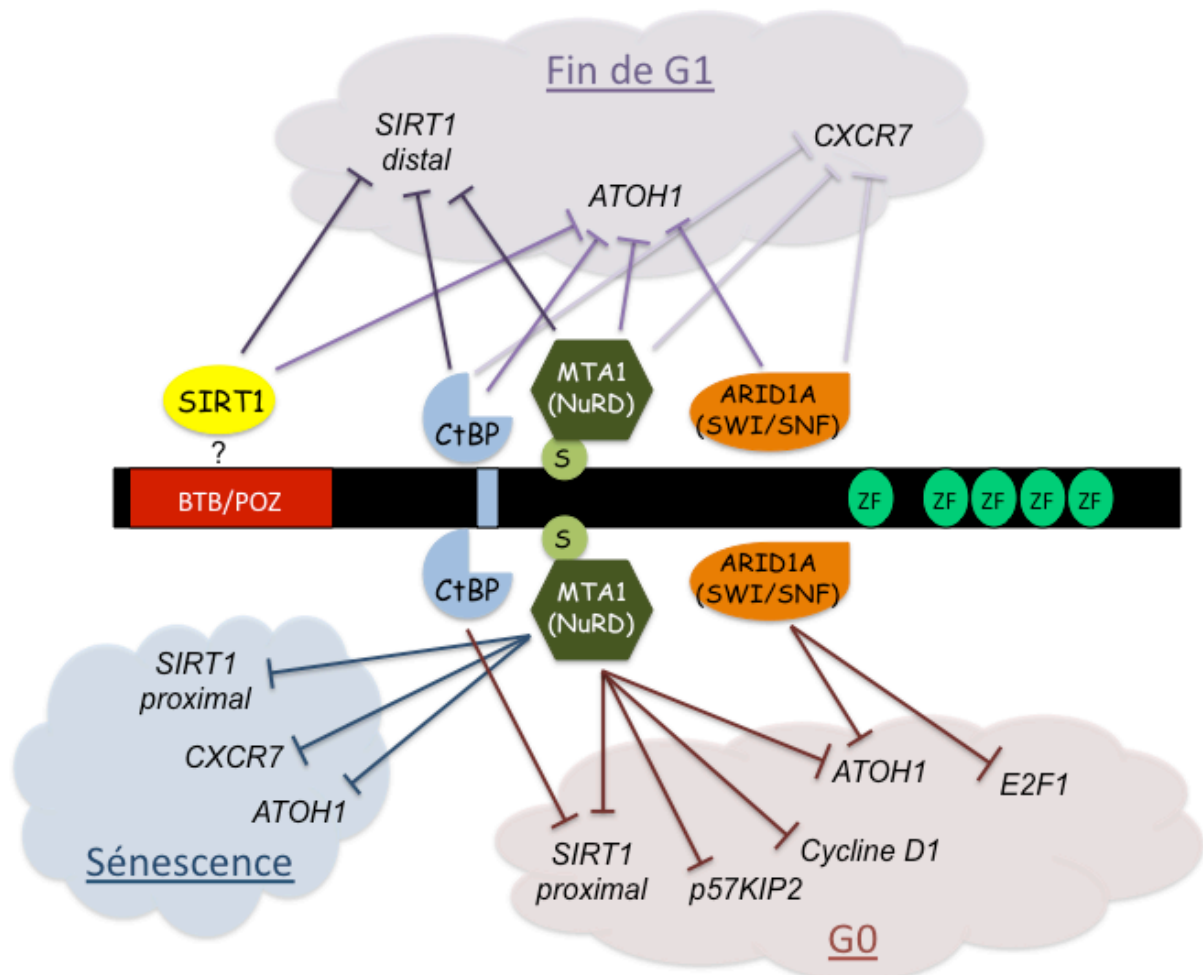


Figure 66 : Mécanismes de répression transcriptionnelle mis en place par HIC1 sur ses gènes cibles directs, en fonction de l'état de croissance cellulaire.

Des résultats complémentaires ont été ajoutés dans cette figure. En effet, l'étude par ChIP-reChIP du recrutement des corépresseurs de HIC1 sur ses gènes cibles, en fonction de l'état

de croissance des cellules, nous a également mené à étudier l'état de sénescence. En effet, les WI38, fibroblastes humains primaires, sénescents relativement rapidement en culture sur plastique. Nous avons donc étudié le recrutement de CtBP et de MTA1 sur les gènes cibles nouvellement identifiés ainsi que sur ceux déjà connus. Ces expériences nous ont permis de conclure que CtBP n'est pas impliquée dans la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1 au sein de cellules sénescents, et que MTA1 régulerait *SIRT1*, *CXCR7* et *ATOH1*. Ces résultats sont présentés sur la figure suivante.

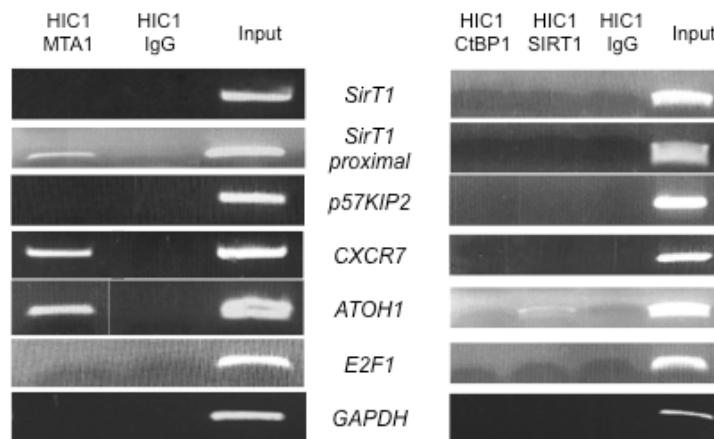


Figure 67 : ChIP-reChIP en fibroblastes WI38 au stade de sénescence répliquative.

Bien que la présence de HIC1 sur le promoteur du gène *Cycline D1* dans les cellules sénescents n'ait pas encore été regardée, ces résultats sont tout de même différents de ceux obtenus pour les cellules quiescentes, montrant un rôle différent de HIC1 au sein de ces deux états cellulaires. Deux différences essentielles sont observées entre ces deux conditions. Tout d'abord, tandis que CtBP est impliquée dans la répression transcriptionnelle mise en place par HIC1 sur le site proximal du promoteur de *SIRT1* dans des cellules en G0, cette protéine n'est pas présente sur cette région du promoteur au sein de fibroblastes sénescents. D'autre part, deux gènes cibles différents : *p57KIP2* est ciblé dans les cellules quiescentes et non dans les cellules sénescents, alors que l'inverse est observé pour *CXCR7*.

Il pourrait donc s'avérer intéressant d'approfondir l'étude du rôle de HIC1 au cours de la sénescence. Des résultats préliminaires tendent à montrer qu'elle serait favorisée en présence de HIC1. En effet, des cellules SW480 (adénocarcinome du colon) transfectées stablement par HIC1 présentent une augmentation significative du taux de cellules positives

pour la SA β Gal (marquage d'une activité lysosomale élevée, utilisé typiquement comme marqueur de sénescence) par rapport aux cellules transfectées stablement avec un vecteur vide (Capucine Van Rechem, résultats non publiés).

Etant donné la littérature actuelle, au moins en ce qui concerne le rôle de SIRT1 dans la sénescence, les résultats que nous avons obtenu récemment et suggérant un rôle de HIC1 dans la promotion de celle-ci ne sont pas aberrants. Un exemple est illustré dans la figure suivante.

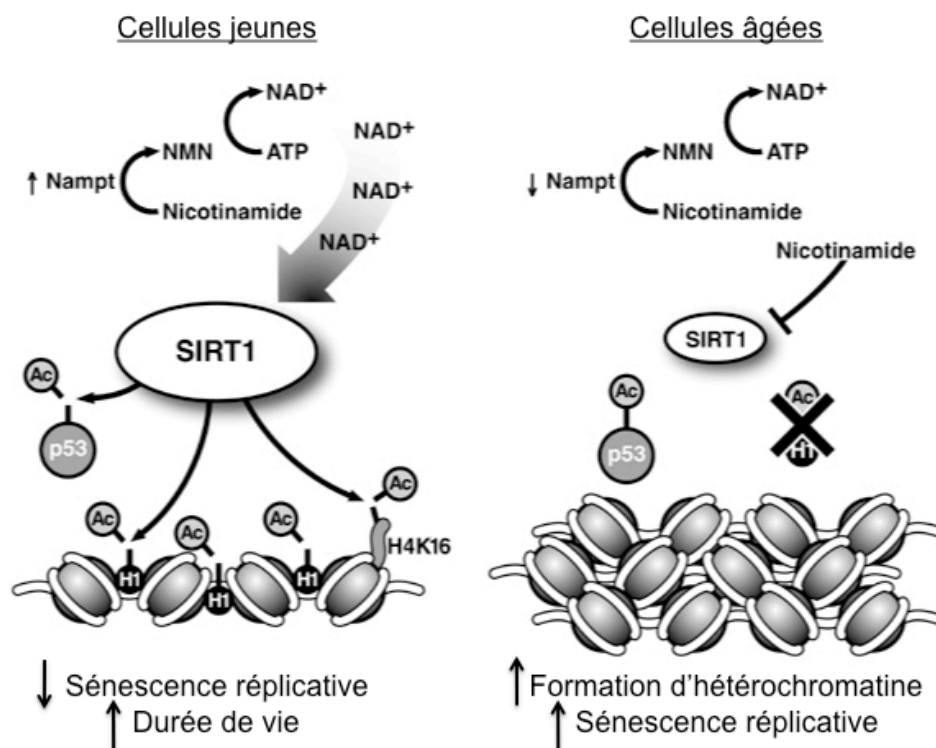


Figure 68 : Niveau d'expression de SIRT1 en fonction de l'âge des cellules et effets associés (Saunders & Verdin, 2007).

L'expression et l'activité de SIRT1 diminuent en fonction de l'âge. Il est observé des taux élevés de SIRT1 dans les cellules jeunes associés à des taux élevés de NAD⁺, menant à la désacétylation de p53 et des histones, ce qui promeut la longévité. Au sein de cellules âgées, les taux de SIRT1 sont plus faibles, et des taux importants de nicotinamide inhibent l'action de cette protéine. L'hyperacétylation résultante de p53 peut donc induire la sénescence répllicative (Saunders & Verdin, 2007).

L'empêchement de la répression de SIRT1 avec l'âge pourrait donc promouvoir la survie cellulaire suite à des dommages oxydatifs, menant ainsi à l'accumulation de mutations et augmentant de risque de cancérisation (Saunders & Verdin, 2007).

HIC1 pourrait donc facilement participer à cette régulation, puisque se trouvant dans la région proximale du promoteur de *SIRT1* pendant la sénescence, ce qui pourrait ajouter à ce scénario une régulation supplémentaire du taux de SIRT1 au niveau de la répression de la transcription de son gène. A condition bien entendu que *HIC1* ne soit pas lui-même éteint par hyperméthylation.

Ce schéma général est corroboré par une étude décrivant le taux de SIRT1 au sein de fibroblastes humains et murins, cellules utilisées comme modèle au cours de notre travail. Au sein de ces fibroblastes, le taux de SIRT1 diminue significativement en fonction du nombre de passages ; il est d'ailleurs corrélé à celui du marqueur de prolifération PCNA. Par contre, ces auteurs n'ont pas constaté de variation significative du taux d'ARN SIRT1, ce qui peut aisément s'expliquer par des régulations nouvellement identifiées par les miRNA, comme nous l'avons décrit dans l'introduction. Chez l'animal, le taux de SIRT1 diminue avec l'âge au sein de tissus dans lesquels l'activité mitotique décline (Sasaki et al., 2006).

Il s'avère pourtant que le rôle de SIRT1 concernant la sénescence ne soit pas si simple. En effet, alors qu'il est montré que SIRT1 serait génératrice de survie cellulaire en réponse au stress par désacétylation de p53, augmentant sa stabilité et son activité, la situation inverse est également décrite. Une étude au sein de fibroblastes montre que SIRT1 augmente le taux de p53 dans des conditions de dommages oxydatifs, causant ainsi la sénescence cellulaire (Potente & Dimmeler, 2008).

Par ailleurs, SIRT1 est également impliquée dans des processus associés à la sénescence. Elle est par exemple liée à la régulation autophagique. Ce phénomène d'autophagie, conservé dans l'évolution, est un processus de « ménage » cellulaire détruisant les organelles et molécules aberrantes et disfonctionnelles. Ce phénomène décline avec l'âge, et SIRT1, par désacétylation des protéines ATG (AuTophaGy) impliquées dans ce processus, stimule ce phénomène (Salminen & Kaarniranta, 2009).

Sur cette figure générale de résultats (Figure 65), nous pouvons également remarquer que le gène proneuronal *ATOH1* est réprimé dans toutes les conditions de croissance, et ce par différents mécanismes. Ceci ne paraît pas étonnant, étant donné que l'on se trouve au sein de fibroblastes, cellules dans lesquelles un facteur neuronal n'a aucune raison d'être exprimé.

Dans le but de simplifier cette figure générale de conclusion, nous avons choisi d'omettre de discuter le cas du gène *ATOH1*, ainsi que les résultats, encore partiels, portant sur le rôle de HIC1 dans la sénescence. Nous allons donc restreindre les figures représentant les conclusions générales de ce travail de thèse aux nouveaux gènes cibles identifiés ainsi qu'à *SIRT1*.

Sur la figure suivante sont représentés les nouveaux gènes cibles directs de HIC1 identifiés au cours de ce travail.

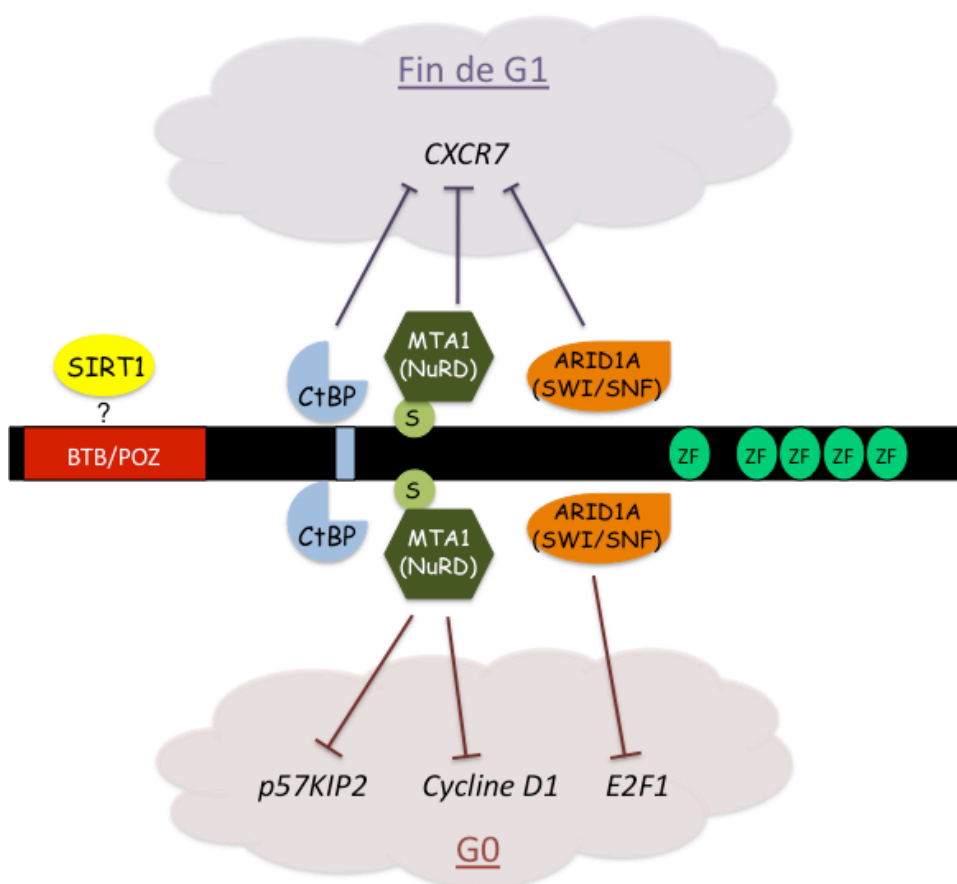


Figure 69 : Les cibles de HIC1 diffèrent en fonction des stades du cycle cellulaire, et impliquent essentiellement le complexe NuRD.

D'une manière générale, cette figure montre que lorsque les cellules se trouvent au stade G0, HIC1 réprime des gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

La plupart des cellules d'un organisme adulte se trouvent au stade de quiescence dit G0, c'est à dire de non division. Le cytoplasme de ces cellules ne contient pas de Cyclines et les

protéines de la famille E2F sont maintenues inactives par Rb (Rétinoblastoma). Ces cellules peuvent tout de même entrer à nouveau dans le cycle après un stimulus mitogène, ce qui a notamment comme conséquence directe la transcription des gènes codant les Cyclines D.

La Cycline D1 est considérée comme un marqueur de la phase G1. Elle s'accumule au cours de cette phase, ce qui entraîne son association avec les kinases dépendantes des cyclines CDK4 et 6 (Cyclin Dependante Kinase). Ces couples phosphorylent et inactivent la protéine Rb, ce qui a pour conséquence la libération des facteurs de transcription E2F, et donc l'expression de gènes nécessaires à la transition des phases G1/S ainsi qu'à la progression au sein de la phase S (comme par exemple la synthèse des Cyclines E et A).

Il n'est donc pas étonnant que HIC1, protéine codée par un gène suppresseur de tumeurs, soit en partie responsable du maintien des cellules dans un état quiescent, via la répression des gènes *E2F1* et *Cycline D1*. De plus, HIC1 est requise pour l'arrêt de croissance induite par privation de sérum des fibroblastes primaires humains HSF8, puisque l'extinction de l'expression de ce gène par ARN interférant empêche cet arrêt de croissance (Zhang et al., 2009).

Le fait que *p57KIP2* soit également un gène cible direct de HIC1 dans ces conditions de croissance s'accorde avec ce modèle. La protéine codée par ce gène est considérée, à juste titre, comme un inhibiteur de CDK. En effet, elle inhibe l'activité des complexes CDK2/Cycline E et CDK2/Cycline A, couples responsables de l'entrée en phase S. Cependant, une autre de ses fonctions est l'assemblage du couple CDK6/Cycline D, qui, comme nous venons de le voir, promeut l'avancée au cours de la phase G1 (Li et al., 2004). HIC1 inhibe donc *p57KIP2* et *Cycline D1*, deux gènes inhérents à la phase G1.

Au stade tardif de la phase G1, HIC1 réprime le gène codant le récepteur CXCR7.

Les CXCR sont les récepteurs des chemokines CXC, qui présentent une activité angiogénique ou angiostatique. CXCR7, récemment identifié et initialement baptisé RDC1, est exprimé dans les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs, mais pas dans la vascularisation normale. Depuis la découverte de son interaction avec la chémokine CXCL12/SDF-1, résultant en un effet prolifératif, ce récepteur n'est plus orphelin. CXCR7 est critique pour la survie mise en place par cette chemokine (Vandercappellen et al., 2008 ; Thelen & Thelen, 2008).

Ce récepteur agirait en captant les molécules, mais sans pour autant entraîner l'activation d'une voie de signalisation. Les chemokines sont essentielles pour le recrutement des leucocytes pendant l'inflammation (Thelen & Thelen, 2008). La séquestration de celles-ci par des récepteurs tels que CXCR7, sans réponse de signalisation, pourrait réguler différemment cette exportation cellulaire spécifique.

L'expression de CXCR7 est corrélée avec l'agressivité tumorale dans le cancer de la prostate. De plus, elle entraîne des métastases dans les tumeurs de sein et de poumon (Vandercappellen et al., 2008 ; Thelen & Thelen, 2008).

Etant donné l'implication de cette protéine dans les cancers, on peut aisément comprendre le rôle suppresseur de tumeurs de HIC1 à travers la répression de la transcription de *CXCR7*. De plus, les types tumoraux au sein desquels ce récepteur est surexprimé et pour lesquels il est responsable, si ce n'est des métastases, au moins de la prolifération active, sont les mêmes types au sein desquels l'expression de *HIC1* est régulièrement éteinte.

Par ailleurs, CXCR7, tout comme HIC1, est impliquée dans le développement. Chez le poisson Zèbre, la migration des cellules germinales primordiales est dirigée par la chemokine CXCL12, qui stimule le récepteur CXCR4 à la surface de ces cellules. Il se forme un gradient d'expression de CXCL12 à travers la régulation de son expression, qui mène à la formation d'un sillon de balisage pour ces cellules. CXCR7 capte CXCL12 localement et participe à la formation de ce gradient de chemokine. Il est observé une expression régulée des récepteurs CXCR7 et CXCR4 au sein des cellules migratoires du primordium ; CXCR7 se trouve de manière prédominante à la surface des cellules « de balisage » tandis que CXCR4 à celle des cellules « de tête » (Thelen & Thelen, 2008).

Il n'est donc pas étonnant que HIC1 puisse réguler l'expression d'un gène codant ce récepteur assez particulier, largement impliqué dans la cancérisation et le développement, par son rôle dans les phénomènes de migration et de prolifération.

Ce travail nous a donc permis de mettre en évidence différents gènes cibles de HIC1, en fonction des étapes du cycle cellulaire. Cette répression, mise en place par HIC1 selon l'état de croissance des fibroblastes primaires, paraît jusqu'alors être essentiellement due au complexe NuRD. Cependant, ce schéma général montre bien que, comme dans le cas de BCL6, différents complexes de répression transcriptionnels peuvent cibler différents gènes cibles, et même être exclusifs de ceux-ci.

Une perspective à cours terme concernant la caractérisation des mécanismes différentiels de répression transcriptionnelle mise en place par HIC1 concerne les protéines BCL11. En effet, bien que l'interaction de HIC1 avec BCL11A et BCL11B soit caractérisée, la fonction reste alors inconnue. Elle pourrait s'avérer être responsable d'un nouveau mécanisme répressif, et ce pourquoi pas dans un contexte encore différent de ceux décrits ici. Ces rôles pourraient

avoir lieu au sein de cellules caractéristiques, comme par exemple les lymphocytes, puisque l'inactivation des gènes codant ces protéines montre, d'une part, que BCL11A est fondamentale au développement normal des lymphocytes B, et d'autre part que BCL11B est nécessaire à celui des cellules T. De plus, les expressions embryonnaires de *Hic1* et *Bcl11B* chez la souris sont particulièrement importantes dans le thymus, et les souris *Hic1*^{-/-} présentent des défauts des cellules T ainsi que des anomalies de développement du thymus, tout comme les souris *Bcl11B*^{-/-} (Grimm et al., 1999 ; Leid et al., 2004 ; Carter et al., 2000 ; Wakabayashi et al., 2003).

Ce travail de thèse a également contribué à identifier un autre niveau de complexité concernant la régulation du gène codant la désacétylase de classe III, SIRT1.

La figure suivante représente l'effet de HIC1 sur le promoteur de *SIRT1*, en fonction des stades étudiés du cycle cellulaire, c'est-à-dire fin de phase G1 et phase de quiescence, G0.

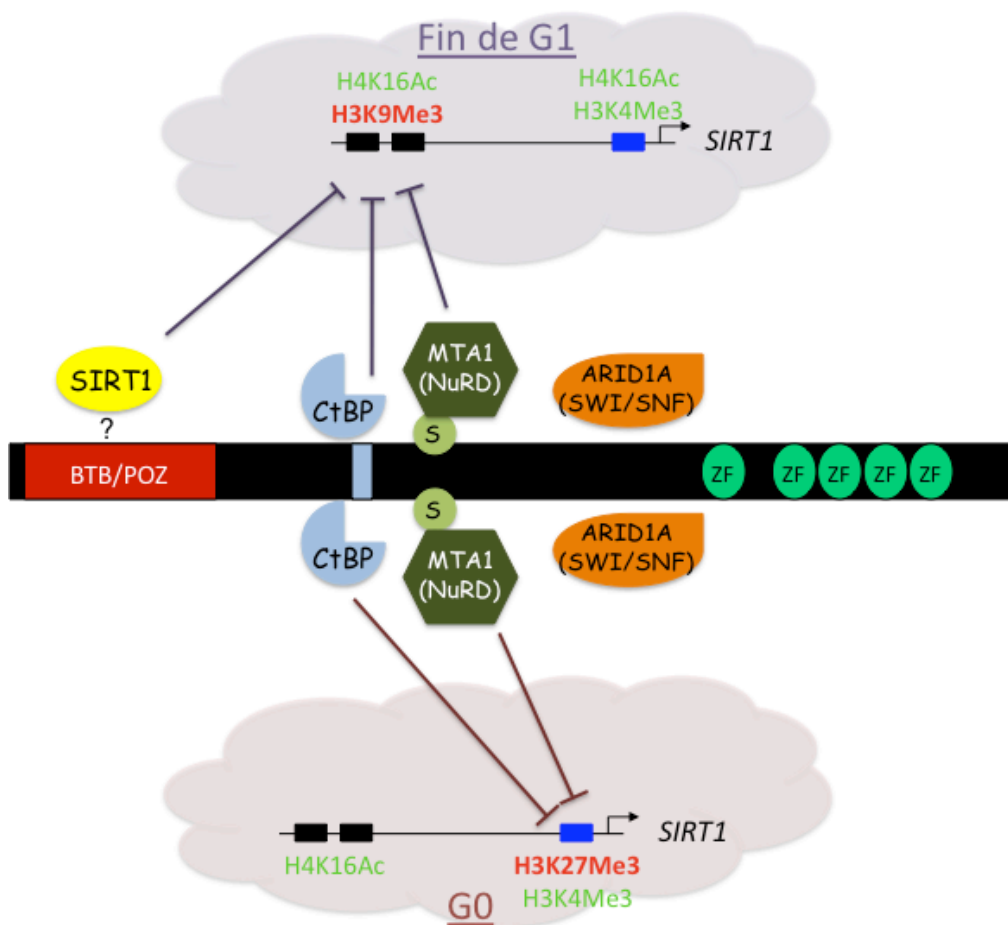


Figure 70 : Répression de *SIRT1* par HIC1 et modifications épigénétiques associées, en fonction de l'état de croissance cellulaire. Les marques épigénétiques activatrices sont indiquées en vert, celles associées à une répression transcriptionnelle en rouge.

Lorsque l'on compare ces résultats à l'ensemble de ceux obtenus, deux choses ressortent en premier lieu. Tout d'abord, *SIRT1* est l'un des seuls gènes cibles, parmi le faible nombre connu jusqu'ici, pour lequel NuRD et CtBP sont impliqués dans la répression établie par HIC1 (et ce même lors de la sénescence répliative). Le trop petit nombre de gènes cibles connus ne permet pas de conclure sur un mécanisme ou un rôle général à ceci. Cependant, au vu de la littérature et des résultats obtenus, ceci ouvre une piste intéressante pour une mise en place de cette répression puisque le recrutement de CtBP est régulé par le métabolisme, tandis que la répression via le complexe NuRD serait plus constitutive.

De plus, il est jusqu'alors le seul gène décrit, en plus d'*ATOH1*, comme étant réprimé par un autre partenaire de HIC1 : SIRT1 elle-même. Et ce uniquement sur les sites distaux, lorsque les cellules sont en croissance.

L'existence de deux sites différents, utilisés à des stades cellulaires différents, mène à l'hypothèse de relevances physiologiques différentes. En effet, pourquoi deux types de sites mutuellement exclusifs ?

Un premier élément de réponse est apporté grâce à l'étude de certaines marques épigénétiques présentes dans les régions contenant ces sites. En effet, les marques activatrices et répressives ne sont pas les mêmes. Au sein de ces deux régions ont été identifiées une marque activatrice, qui est toujours présente, et une marque répressive, présente uniquement en même temps que HIC1.

En ce qui concerne les sites distaux, la marque activatrice identifiée est H4K16 acétylée. Elle est toujours présente, que les cellules soient entrées dans le cycle ou quiescentes. Nous pouvons d'ailleurs noter ici que, contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre étant donné les éléments de la littérature, SIRT1 ne serait pas là pour désacétyler « sa » cible, puisque H4K16Ac est toujours présente, quel que soit l'état étudié, c'est à dire en absence ou en présence de SIRT1 au promoteur. Par contre, lorsque HIC1 et ses partenaires sont présents, on note l'apparition de la marque répressive H3K9 triméthylée. Cette marque a été décrite associée à l'hétérochromatine facultative, c'est à dire une chromatine pouvant alterner entre des statuts actifs et répressifs de la transcription. Cette marque épigénétique est en ce sens considérée comme étant labile, ce qui pourrait mener à la conclusion d'une régulation fine et « facilement » modulable de la transcription de *SIRT1* via cette région.

Ainsi, dans des cellules en croissance, la transcription de *SIRT1* pourrait être contrôlée de manière à pouvoir s'adapter rapidement, en fonction des signaux reçus par la cellule comme par exemple les dommages à l'ADN. Cette hypothèse n'est donc pas opposable à une « vie active » de la cellule.

Il n'en est pas de même en ce qui concerne le site proximal. Dans ce cas, la marque activatrice toujours présente est H3K4 triméthylée. Lorsque HIC1 est recrutée il y a apparition de la marque répressive H3K27 triméthylée.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises à partir de cette observation. Tout d'abord, cette marque répressive est caractéristique d'une chromatine fermée et inaccessible et considérée comme non labile. Elle serait donc synonyme d'une répression transcriptionnelle à long terme, et pourquoi pas plus importante puisque liée aux complexes Polycomb et potentiellement à la méthylation de l'ADN. C'est d'ailleurs ce que montre les taux de protéines de SIRT1 de ces deux stades du cycle cellulaire : ce taux protéique est en effet plus élevé lorsque les fibroblastes sont en croissance. Au sein de cellules quiescentes, *SIRT1* se trouve donc certainement dans un état transcriptionnellement éteint.

De plus, ce site HiRE est placé au voisinage d'une séquence cible de l'activateur transcriptionnel E2F1. La présence de HIC1 et d'une chromatine fermée pourrait donc bloquer l'accès de cette protéine, accès qui serait libre lors de la phase G1 tardive, présageant une labilité « on-off » à la transcription encore plus importante lors de cette phase.

On peut également noter que les marques épigénétiques H3K4Me3 et H3K27Me3, présentent au sein de la même région, sont caractéristiques des domaines bivalents.

Les perspectives à court terme, en ce qui concerne ce projet, sont la caractérisation des facteurs responsables de la mise en place des marques épigénétiques sur ses différents sites. L'hypothèse concernant ces perspectives est représentée sur la figure 71.

D'après ce que montrent nos résultats, SIRT1 ne serait pas recrutée par HIC1 à son propre promoteur pour désacétyler la Lysine 16 de l'histone H4. Par contre, elle pourrait être responsable, de manière indirecte, du dépôt de la marque épigénétique répressive H3K9Me3. En effet, il est décrit que SIRT1 cible SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homologue 1), la désacétyle au sein de son domaine méthyltransférase SET, ce qui contribue à l'augmentation de son activité, donc à la triméthylation de la Lysine 9 de l'histone H3 (Vaquero et al., 2007).

En ce qui concerne la marque répressive H3K27Me3, elle pourrait être mise en place par les complexes Polycomb PcG. Ces complexes sont en effet largement décrits responsables du dépôt de cette marque.

Tout d'abord, un lien a été décrit entre le complexe NuRD, plus précisément entre MBD3 - protéine décrite ici-même interagissant avec HIC1 - et la déposition de la marque épigénétique H3K27Me3 à un promoteur cible. La présence du complexe NuRD au promoteur est nécessaire à celle plus tardive de l'histone méthyltransférase EZH2 ainsi que de la méthylase de l'ADN DNMT3 (Morey et al., 2008).

De plus, au sein de l'équipe a été décrite l'interaction de HIC1 avec certains membres des complexes Polycomb, ce qui constitue le travail de Thèse de Gaylord Boulay (Gaylord Boulay, résultats non publiés).

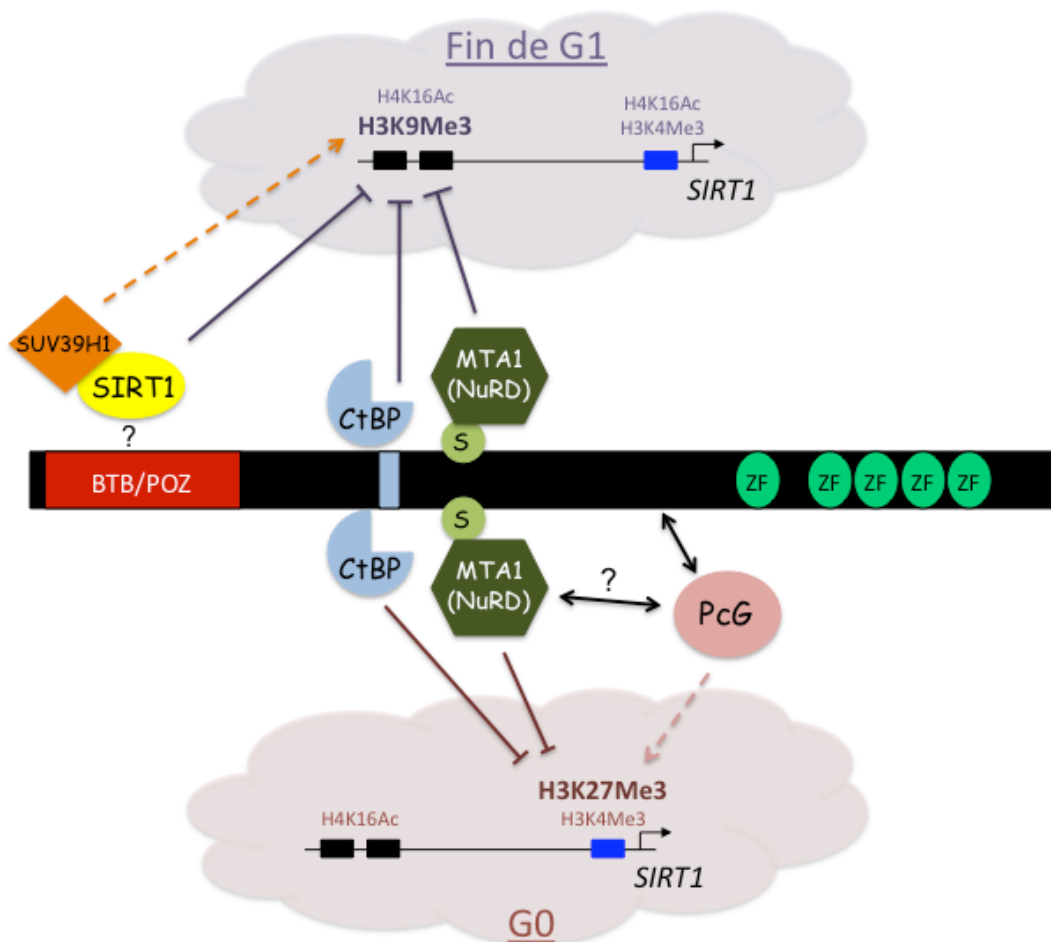


Figure 71 : Hypothèse concernant la mise en place des marques épigénétiques lors de la répression transcriptionnelle de *SIRT1* par HIC1.

Ce travail de Thèse aura donc permis d'avancer dans la compréhension des conditions dans lesquelles HIC1 met en place ses mécanismes de répression transcriptionnelle, et éclaire un peu quant au(x) rôle(s) de cette dernière.

Il aura également permis d'ajouter un maillon à la chaîne concernant l'étude de la régulation du promoteur de *SIRT1*, qui n'a certainement pas encore livrée tous ses secrets.

Cependant, il n'aura pas contribué à simplifier la boucle de régulation, qui n'est pas terminée d'être dessinée, impliquant HIC1, SIRT1, E2F1, p53...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abuharbeid, S., Czubayko, F, and Aigner A. (2006). The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1463-1468.
- Ahmad, K. F., Melnick, A., Lax, S., Bouchard, D., Liu, J., Kiang, C. L., Mayer, S., Takahashi, S., Licht, J. D., and Prive, G. G. (2003). Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol Cell* 12, 1551-1564.
- Albu, D. I., Feng, D., Bhattacharya, D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Liu, P., and Avram, D. (2007). BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *J Exp Med* 204, 3003-3015.
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R. R., Selvaggi, T., Kehry, M. R., and Staudt, L. M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87, 5257-5268.
- Anckar, J., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Thiele, D. J., Johnson, M. S., and Sistonen, L. (2006). Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 26, 955-964.
- Anckar, J., and Sistonen, L. (2007). SUMO: getting it on. *Biochem Soc Trans* 35, 1409-1413.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221.
- Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., and Macklis, J. D. (2008). Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J Neurosci* 28, 622-632.
- Au, S. W., Lam, K. H., Lam, W. L., Lam, L. S., Chan, H. Y., Xu, Z., and Ng, T. B. (2009). SUMO proteases: Redox regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D. J., Ishmael, J. E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* 275, 10315-10322.
- Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A., and Leid, M. (2002). COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem J* 368, 555-563.
- Ayyanathan, K., Lechner, M. S., Bell, P., Maul, G. G., Schultz, D. C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher, F. J., 3rd (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene

- induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev* 17, 1855-1869.
- Bagheri-Yarmand, R., Balasenthil, S., Gururaj, A. E., Talukder, A. H., Wang, Y. H., Lee, J. H., Kim, Y. S., Zhang, X., Jones, D. M., Medeiros, L. J., *et al.* (2007). Metastasis-associated protein 1 transgenic mice: a new model of spontaneous B-cell lymphomas. *Cancer Res* 67, 7062-7067.
- Bagheri-Yarmand, R., Talukder, A. H., Wang, R. A., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. (2004). Metastasis-associated protein 1 deregulation causes inappropriate mammary gland development and tumorigenesis. *Development* 131, 3469-3479.
- Balasenthil, S., Gururaj, A. E., Talukder, A. H., Bagheri-Yarmand, R., Arrington, T., Haas, B. J., Braisted, J. C., Kim, I., Lee, N. H., and Kumar, R. (2007). Identification of Pax5 as a target of MTA1 in B-cell lymphomas. *Cancer Res* 67, 7132-7138.
- Baylin, S. B., and Ohm, J. E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107-116.
- Bereshchenko, O. R., Gu, W., and Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet* 32, 606-613.
- Bergman, L. M., and Blaydes, J. P. (2006). C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis. *Apoptosis* 11, 879-888.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J., and Lima, C. D. (2002). Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108, 345-356.
- Bertrand, S., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour-Balerdi, S., Guerardel, C., Bègue, A., Laudet, V., and Leprince, D. (2004). Identification and développementale expression of the zebrafish orthologue of the tumor suppressor gene HIC1. *Biochim Biophys Acta* 1678, 57-66.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bird, A. P., and Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.
- Bossis, G., Malnou, C. E., Farras, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., Schmidt, D., Muller, S., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2005). Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* 25, 6964-6979.
- Bossis, G., and Melchior, F. (2006). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div* 1, 13.
- Bouazoune, K., Mitterweger, A., Langst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P. B., and Brehm, A. (2002). The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *Embo J* 21, 2430-2440.

- Bouras, T., Fu, M., Sauve, A. A., Wang, F., Quong, A. A., Perkins, N. D., Hay, R. T., Gu, W., and Pestell, R. G. (2005). SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* 280, 10264-10276.
- Bowen, N. J., Fujita, N., Kajita, M., and Wade, P. A. (2004). Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* 1677, 52-57.
- Braun, H., Koop, R., Ertmer, A., Nacht, S., and Suske, G. (2001). Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4994-5000.
- Brehm, A., Langst, G., Kehle, J., Clapier, C. R., Imhof, A., Eberharder, A., Muller, J., and Becker, P. B. (2000). dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *Embo J* 19, 4332-4341.
- Briggs, K. J., Corcoran-Schwartz, I. M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W. L., Baylin, S. B., Eberhart, C. G., and Watkins, D. N. (2008a). Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 22, 770-785.
- Briggs, K. J., Eberhart, C. G., and Watkins, D. N. (2008b). Just say no to ATOH: how HIC1 methylation might predispose medulloblastoma to lineage addiction. *Cancer Res* 68, 8654-8656.
- Briones, V. R., Chen, S., Riegel, A. T., and Lechleider, R. J. (2006). Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 595-601.
- Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T. J., Tschan, M. P., Hugli, B., Reddy, V. A., Andres, A. C., Torbett, B. E., Tobler, A., and Fey, M. F. (2006). Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* 25, 2030-2039.
- Brooks, C. L., and Gu, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer* 9, 123-128.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155-164.
- Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G. K., Holsboer, F., and Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 309-323.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Ward, H. L., Toyo-Oka, K., Chung, J., Gross, A., Martin, C. L., Allanson, J., Pilz, D. T., Olney, A. H., *et al.* (2003). Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* 72, 918-930.
- Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., and Baylin, S. B. (2000). Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit

- developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 413-419.
- Carter, S., Bischof, O., Dejean, A., and Vousden, K. H. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 9, 428-435.
- Cattoretti, G., Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S. V., Shen, Q., Mo, T., Murty, V. V., and Dalla-Favera, R. (2005). Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 7, 445-455.
- Cerchietti, L. C., Polo, J. M., Da Silva, G. F., Farinha, P., Shaknovich, R., Gascoyne, R. D., Dowdy, S. F., and Melnick, A. (2008). Sequential transcription factor targeting for diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res* 68, 3361-3369.
- Chen, W., Cooper, T. K., Zahnow, C. A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J. E., Gokgoz, N., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., *et al.* (2004). Epigenetic and genetic loss of *Hic1* function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 387-398.
- Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S. B. (2005). Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123, 437-448.
- Chen, W. Y., Zeng, X., Carter, M. G., Morrell, C. N., Chiu Yen, R. W., Esteller, M., Watkins, D. N., Herman, J. G., Mankowski, J. L., and Baylin, S. B. (2003). Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 33, 197-202.
- Chen, Z., Luo, H. Y., Steinberg, M. H., and Chui, D. H. (2009). BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis* 42, 144-149.
- Cheng, C. H., Lo, Y. H., Liang, S. S., Ti, S. C., Lin, F. M., Yeh, C. H., Huang, H. Y., and Wang, T. F. (2006). SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 2067-2081.
- Cheng, J., Wang, D., Wang, Z., and Yeh, E. T. (2004). SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 24, 6021-6028.
- Chevallier, N., Corcoran, C. M., Lennon, C., Hyjek, E., Chadburn, A., Bardwell, V. J., Licht, J. D., and Melnick, A. (2004). ETO protein of t(8;21) AML is a corepressor for Bcl-6 B-cell lymphoma oncoprotein. *Blood* 103, 1454-1463.
- Chinnadurai, G. (2007). Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1593-1607.
- Chinnadurai, G. (2009). The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* 69, 731-734.

- Ci, W., Polo, J. M., and Melnick, A. (2008). B-cell lymphoma 6 and the molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* 15, 381-390.
- Cismasiu, V. B., Adamo, K., Gecewicz, J., Duque, J., Lin, Q., and Avram, D. (2005). BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* 24, 6753-6764.
- Cismasiu, V. B., Duque, J., Paskaleva, E., Califano, D., Ghanta, S., Young, H. A., and Avram, D. (2009). BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF-kappaB activation through up-regulation of Cot kinase gene expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 417, 457-466.
- Cismasiu, V. B., Ghanta, S., Duque, J., Albu, D. I., Chen, H. M., Kasturi, R., and Avram, D. (2006). BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood* 108, 2695-2702.
- Cismasiu, V. B., Paskaleva, E., Suman Daya, S., Canki, M., Duus, K., and Avram, D. (2008). BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* 380, 173-181.
- Corona, D. F., Siriaco, G., Armstrong, J. A., Snarskaya, N., McClymont, S. A., Scott, M. P., and Tamkun, J. W. (2007). ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo. *PLoS Biol* 5, e232.
- Crook, J. M., Dunn, N. R., and Colman, A. (2006). Repressed by a NuRD. *Nat Cell Biol* 8, 212-214.
- Daniel, A. R., Faivre, E. J., and Lange, C. A. (2007). Phosphorylation-dependent antagonism of sumoylation derepresses progesterone receptor action in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 21, 2890-2906.
- Deltour, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (1999). Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14831-14836.
- Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (2001). Characterization of HRG22, a human homologue of the putative tumor suppressor gene HIC1. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 427-434.
- Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, B., and Leprince, D. (2002). The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol Cell Biol* 22, 4890-4901.
- Denslow, S. A., and Wade, P. A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26, 5433-5438.
- DePinho, R. A. (2000). The age of cancer. *Nature* 408, 248-254.
- Desplats, P. A., Lambert, J. R., and Thomas, E. A. (2008). Functional roles for the striatal-enriched transcription factor, Bcl11b, in the control of striatal gene expression and transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 31, 298-308.

- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* *2*, 233-239.
- Dhordain, P., Albagli, O., Honore, N., Guidez, F., Lantoine, D., Schmid, M., The, H. D., Zelent, A., and Koken, M. H. (2000). Colocalization and heteromerization between the two human oncogene POZ/zinc finger proteins, LAZ3 (BCL6) and PLZF. *Oncogene* *19*, 6240-6250.
- Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Leprince, D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10762-10767.
- Diella, F., Chabanis, S., Luck, K., Chica, C., Ramu, C., Nerlov, C., and Gibson, T. J. (2009). KEPE--a motif frequently superimposed on sumoylation sites in metazoan chromatin proteins and transcription factors. *Bioinformatics* *25*, 1-5.
- Eckert-Boulet, N., and Lisby, M. (2009). Regulation of rDNA stability by sumoylation. *DNA Repair (Amst)* *8*, 507-516.
- Evdokimov, E., Sharma, P., Lockett, S. J., Lualdi, M., and Kuehn, M. R. (2008). Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci* *121*, 4106-4113.
- Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., and Orr, A. (1999). Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* *112 (Pt 24)*, 4581-4588.
- Fahrner, J. A., and Baylin, S. B. (2003). Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad. *Genes Dev* *17*, 1805-1812.
- Feige, J. N., and Auwerx, J. (2008). Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol* *20*, 303-309.
- Feng, Q., Deftereos, G., Hawes, S. E., Stern, J. E., Willner, J. B., Swisher, E. M., Xi, L., Drescher, C., Urban, N., and Kiviat, N. (2008). DNA hypermethylation, Her-2/neu overexpression and p53 mutations in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* *111*, 320-329.
- Fleming, J. L., Huang, T. H., and Toland, A. E. (2008). The role of parental and grandparental epigenetic alterations in familial cancer risk. *Cancer Res* *68*, 9116-9121.
- Fleuriel, C., Touka, M., Boulay, G., Guerardel, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2009). HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol* *41*, 26-33.
- Flowers, S., Nagl, N. G., Jr., Beck, G. R., Jr., and Moran, E. (2009). Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation. *J Biol Chem* *284*, 10067-10075.
- Fujii, H., Biel, M. A., Zhou, W., Weitzman, S. A., Baylin, S. B., and Gabrielson, E. (1998). Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* *16*, 2159-2164.

- Fujita, N., Jaye, D. L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M. R., Boss, J. M., and Wade, P. A. (2004). MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* 119, 75-86.
- Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31, 2305-2312.
- Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., and Mackay, J. P. (2007). Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* 32, 63-70.
- Gao, C., Ho, C. C., Reineke, E., Lam, M., Cheng, X., Stanya, K. J., Liu, Y., Chakraborty, S., Shih, H. M., and Kao, H. Y. (2008). Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol Cell Biol* 28, 5658-5667.
- Gearhart, M. D., Corcoran, C. M., Wamstad, J. A., and Bardwell, V. J. (2006). Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol* 26, 6880-6889.
- Ghetu, A. F., Corcoran, C. M., Cerchiatti, L., Bardwell, V. J., Melnick, A., and Prive, G. G. (2008). Structure of a BCOR corepressor peptide in complex with the BCL6 BTB domain dimer. *Mol Cell* 29, 384-391.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-541.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Golonzhka, O., Leid, M., Indra, G., and Indra, A. K. (2007). Expression of COUP-TF-interacting protein 2 (CTIP2) in mouse skin during development and in adulthood. *Gene Expr Patterns* 7, 754-760.
- Golonzhka, O., Metzger, D., Bornert, J. M., Bay, B. K., Gross, M. K., Kioussi, C., and Leid, M. (2009). Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4278-4283.
- Gong, Z., Brackertz, M., and Renkawitz, R. (2006). SUMO modification enhances p66-mediated transcriptional repression of the Mi-2/NuRD complex. *Mol Cell Biol* 26, 4519-4528.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-6471.
- Grabarczyk, P., Przybylski, G. K., Depke, M., Volker, U., Bahr, J., Assmus, K., Broker, B. M., Walther, R., and Schmidt, C. A. (2007). Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene* 26, 3797-3810.

- Gregoire, S., Tremblay, A. M., Xiao, L., Yang, Q., Ma, K., Nie, J., Mao, Z., Wu, Z., Giguere, V., and Yang, X. J. (2006). Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281, 4423-4433.
- Gresko, E., Ritterhoff, S., Sevilla-Perez, J., Roscic, A., Frobius, K., Kotevic, I., Vichalkovski, A., Hess, D., Hemmings, B. A., and Schmitz, M. L. (2009). PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28, 698-708.
- Grimm, C., Sporle, R., Schmid, T. E., Adler, I. D., Adamski, J., Schughart, K., and Graw, J. (1999). Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene *Hic1*, the homologue of *HIC1*, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 697-710.
- Gronemeyer, H., and Zelent, A. (2009). Fingering modulators of retinoic acid signaling identifies new prognostic marker for neuroblastoma. *Cancer Cell* 15, 249-251.
- Guerardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A. K., and Leprince, D. (2001). Identification in the human candidate tumor suppressor gene *HIC-1* of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem* 276, 3078-3089.
- Guo, B., and Sharrocks, A. D. (2009). ERK MAP kinase signalling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol*.
- Gururaj, A. E., Singh, R. R., Rayala, S. K., Holm, C., den Hollander, P., Zhang, H., Balasenthil, S., Talukder, A. H., Landberg, G., and Kumar, R. (2006). MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6670-6675.
- Guschin, D., Wade, P. A., Kikyo, N., and Wolffe, A. P. (2000). ATP-Dependent histone octamer mobilization and histone deacetylation mediated by the Mi-2 chromatin remodeling complex. *Biochemistry* 39, 5238-5245.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., and Schar, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21, 1456-1464.
- Hayakawa, F., Abe, A., Kitabayashi, I., Pandolfi, P. P., and Naoe, T. (2008). Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283, 24420-24425.
- Hebert, J., Romana, S. P., Hillion, J., Kerkaert, J. P., Bastard, C., and Berger, R. (1993). Translocation t(3;22)(q27;q11) in non-Hodgkin's malignant lymphoma: chromosome painting and molecular studies. *Leukemia* 7, 1971-1974.
- Heideker, J., Perry, J. J., and Boddy, M. N. (2009). Genome stability roles of SUMO-targeted ubiquitin ligases. *DNA Repair (Amst)* 8, 517-524.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine

- 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 2953-2968.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 45-50.
- Hilgarth, R. S., Hong, Y., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2003). Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 SUMO-1 modification. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 196-200.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hofer, M. D., Menke, A., Genze, F., Gierschik, P., and Giehl, K. (2004). Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 90, 455-462.
- Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y. Y., Kori, R., Vakoc, C. R., Rakowski, C., and Blobel, G. A. (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *Embo J* 24, 2367-2378.
- Huang, S., Laoukili, J., Epping, M. T., Koster, J., Holzel, M., Westerman, B. A., Nijkamp, W., Hata, A., Asgharzadeh, S., Seeger, R. C., *et al.* (2009). ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome. *Cancer Cell* 15, 328-340.
- Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565-576.
- Huynh, K. D., Fischle, W., Verdin, E., and Bardwell, V. J. (2000). BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev* 14, 1810-1823.
- Hystad, M. E., Myklebust, J. H., Bo, T. H., Sivertsen, E. A., Rian, E., Forfang, L., Munthe, E., Rosenwald, A., Chiorazzi, M., Jonassen, I., *et al.* (2007). Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol* 179, 3662-3671.
- Inoue, J., Kanefuji, T., Okazuka, K., Watanabe, H., Mishima, Y., and Kominami, R. (2006). Expression of TCR alpha beta partly rescues developmental arrest and apoptosis of alpha beta T cells in *Bcl11b*^{-/-} mice. *J Immunol* 176, 5871-5879.
- Ivanov, A. V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K. L., Negorev, D. G., Schultz, D. C., Psulkowski, E., Fredericks, W. J., White, D. E., Maul, G. G., *et al.* (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* 28, 823-837.

- Jardin, F., Ruminy, P., Bastard, C., and Tilly, H. (2007). The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol (Paris)* 55, 73-83.
- Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., Vorburger, S. A., Tobler, A., Leprince, D., Fey, M. F., Helin, K., and Tschan, M. P. (2009). The tumor suppressor gene *Hypermethylated in Cancer 1* is transcriptionally regulated by E2F1. *Molecular Cancer Research* 7.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G., and Dasso, M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* 156, 595-602.
- Kamimura, K., Mishima, Y., Obata, M., Endo, T., Aoyagi, Y., and Kominami, R. (2007a). Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene* 26, 5840-5850.
- Kamimura, K., Ohi, H., Kubota, T., Okazuka, K., Yoshikai, Y., Wakabayashi, Y., Aoyagi, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. (2007b). Haploinsufficiency of Bcl11b for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 538-542.
- Kanai, Y., Ushijima, S., Ochiai, A., Eguchi, K., Hui, A., and Hirohashi, S. (1998). DNA hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 122, 135-141.
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8, 550-555.
- Khaleque, M. A., Bharti, A., Gong, J., Gray, P. J., Sachdev, V., Ciocca, D. R., Stati, A., Fanelli, M., and Calderwood, S. K. (2008). Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene* 27, 1886-1893.
- Kim, J. K., Samaranyake, M., and Pradhan, S. (2009). Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 66, 596-612.
- Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352.
- Kirkin, V., and Dikic, I. (2007). Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19, 199-205.
- Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* 21, 2682-2691.

- Klose, R. J., and Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kubicek, S., and Jenuwein, T. (2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell* 119, 903-906.
- Kunert, N., Wagner, E., Murawska, M., Klinker, H., Kremmer, E., and Brehm, A. (2009). dMec: a novel Mi-2 chromatin remodelling complex involved in transcriptional repression. *Embo J* 28, 533-544.
- Kuo, T. Y., and Hsueh, Y. P. (2007). Expression of zinc finger transcription factor Bcl11A/Evi9/CTIP1 in rat brain. *J Neurosci Res* 85, 1628-1636.
- Kuwata, T., and Nakamura, T. (2008). BCL11A is a SUMOylated protein and recruits SUMO-conjugation enzymes in its nuclear body. *Genes Cells* 13, 931-940.
- Kwon, H. S., and Ott, M. (2008). The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci* 33, 517-525.
- Lai, J. S., and Herr, W. (1992). Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 89, 6958-6962.
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547-555.
- Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A. B., Hoeijmakers, W. A., Cohen, A., Lasonder, E., and Stunnenberg, H. G. (2006). MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol* 26, 843-851.
- Lee, M. T., and Bachant, J. (2009). SUMO Modification of DNA topoisomerase II: Trying to get a CENse of it all. *DNA Repair (Amst)* 8, 557-568.
- Lefebvre, T., Pinte, S., Guerardel, C., Deltour, S., Martin-Soudant, N., Slomianny, M. C., Michalski, J. C., and Leprince, D. (2004). The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem* 271, 3843-3854.
- Leid, M., Ishmael, J. E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., and Dolle, P. (2004). CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 4, 733-739.
- Li, G., Domenico, J., Lucas, J. J., and Gelfand E. W. (2004). Identification of multiple cell cycle regulatory functions of p57^{Kip2} in human T lymphocytes. *J Immunol* 173, 2383-2391.
- Li, T., Santockyte, R., Shen, R. F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D. C., and Chock, P. B. (2006). Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways. *J Biol Chem* 281, 36221-36227.
- Li, W., Bao, W., Ma, J., Liu, X., Xu, R., Wang, R. A., and Zhang, Y. (2008a). Metastasis tumor antigen 1 is involved in the resistance to heat stress-induced testicular apoptosis. *FEBS Lett* 582, 869-873.

- Li, W., Zhu, H., Bao, W., Fu, H., Li, Z., Liu, X., Xu, R., Zhao, J., and Zhang, Y. (2008b). Involvement of metastasis tumor antigen 1 in hepatic regeneration and proliferation. *Cell Physiol Biochem* 22, 315-326.
- Li, X., Lee, Y. K., Jeng, J. C., Yen, Y., Schultz, D. C., Shih, H. M., and Ann, D. K. (2007). Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 282, 36177-36189.
- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S. Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A. J., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 10, 731-739.
- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., *et al.* (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354.
- Lin, J. Y., Ohshima, T., and Shimotohno, K. (2004). Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Lett* 573, 15-18.
- Lin, X., Liang, M., Liang, Y. Y., Brunnicardi, F. C., and Feng, X. H. (2003). SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 278, 31043-31048.
- Lindsey, J. C., Lusher, M. E., Anderton, J. A., Bailey, S., Gilbertson, R. J., Pearson, A. D., Ellison, D. W., and Clifford, S. C. (2004). Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis* 25, 661-668.
- Liu, H., Ippolito, G. C., Wall, J. K., Niu, T., Probst, L., Lee, B. S., Pulford, K., Banham, A. H., Stockwin, L., Shaffer, A. L., *et al.* (2006a). Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol Cancer* 5, 18.
- Liu, M., Duke, J. L., Richter, D. J., Vinuesa, C. G., Goodnow, C. C., Kleinstein, S. H., and Schatz, D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Liu, P., Keller, J. R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R. A., Nakamura, T., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2003). Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4, 525-532.
- Liu, T., Liu, P. Y., and Marshall, G. M. (2009). The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* 69, 1702-1705.

- Liu, W., Lagutin, O. V., Mende, M., Streit, A., and Oliver, G. (2006b). Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *Embo J* 25, 5383-5395.
- Long, J., Wang, G., Matsuura, I., He, D., Liu, F. (2004). Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 99-104.
- Lopez, J., Percharde, M., Coley, H. M., Webb, A., and Crook, T. (2009). The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 100, 571-577.
- Lujambio, A., and Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle* 8, 377-382.
- Luo, W. J., Takakuwa, T., Ham, M. F., Wada, N., Liu, A., Fujita, S., Sakane-Ishikawa, E., and Aozasa, K. (2004). Epstein-Barr virus is integrated between REL and BCL-11A in American Burkitt lymphoma cell line (NAB-2). *Lab Invest* 84, 1193-1199.
- Lyst, M. J., Nan, X., and Stancheva, I. (2006). Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins. *Embo J* 25, 5317-5328.
- Mabb, A. M., Wuerzberger-Davis, S. M., and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8, 986-993.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Makhnevych, T., Ptak, C., Lusk, C. P., Aitchison, J. D., and Wozniak, R. W. (2007). The role of karyopherins in the regulated sumoylation of septins. *J Cell Biol* 177, 39-49.
- Manavathi, B., and Kumar, R. (2007). Metastasis tumor antigens, an emerging family of multifaceted master coregulators. *J Biol Chem* 282, 1529-1533.
- Manavathi, B., Peng, S., Rayala, S. K., Talukder, A. H., Wang, M. H., Wang, R. A., Balasenthil, S., Agarwal, N., Frishman, L. J., and Kumar, R. (2007a). Repression of Six3 by a corepressor regulates rhodopsin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13128-13133.
- Manavathi, B., Singh, K., and Kumar, R. (2007b). MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nucl Recept Signal* 5, e010.
- Marban, C., Redel, L., Suzanne, S., Van Lint, C., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Leid, M., Aunis, D., Schaeffer, E., and Rohr, O. (2005). COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells. *Nucleic Acids Res* 33, 2318-2331.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *Embo J* 26, 412-423.

- Maruyama, M., Yamamoto, T., Kohara, Y., Katsuragi, Y., Mishima, Y., Aoyagi, Y., and Kominami, R. (2007). Mtf-1 lymphoma-susceptibility locus affects retention of large thymocytes with high ROS levels in mice after gamma-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 209-215.
- Masclé, X., Albagli, O., and Lemercier, C. (2003). Point mutations in BCL6 DNA-binding domain reveal distinct roles for the six zinc fingers. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 391-396.
- Mateos-Langerak, J., and Cavalli, G. (2008). Polycomb group proteins and long-range gene regulation. *Adv Genet* 61, 45-66.
- Matunis, M. J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140, 499-509.
- Mazumdar, A., Wang, R. A., Mishra, S. K., Adam, L., Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. (2001). Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat Cell Biol* 3, 30-37.
- McKenna, E. S., and Roberts, C. W. (2009). Epigenetics and cancer without genomic instability. *Cell Cycle* 8, 23-26.
- Melki, J. R., Vincent, P. C., and Clark, S. J. (1999). Cancer-specific region of hypermethylation identified within the HIC1 putative tumour suppressor gene in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 13, 877-883.
- Mendez, L. M., Polo, J. M., Yu, J. J., Krupski, M., Ding, B. B., Melnick, A., and Ye, B. H. (2008). CtBP is an essential corepressor for BCL6 autoregulation. *Mol Cell Biol* 28, 2175-2186.
- Menzel, S., Garner, C., Gut, I., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Heath, S., Foglio, M., Zelenika, D., Boland, A., Rooks, H., *et al.* (2007). A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet* 39, 1197-1199.
- Molli, P. R., Singh, R. R., Lee, S. W., and Kumar, R. (2008). MTA1-mediated transcriptional repression of BRCA1 tumor suppressor gene. *Oncogene* 27, 1971-1980.
- Mondal, A. M., Chinnadurai, S., Datta, K., Chauhan, S. S., Sinha, S., and Chattopadhyay, P. (2006). Identification and functional characterization of a novel unspliced transcript variant of HIC-1 in human cancer cells exposed to adverse growth conditions. *Cancer Res* 66, 10466-10477.
- Moon, H. E., Cheon, H., and Lee, M. S. (2007). Metastasis-associated protein 1 inhibits p53-induced apoptosis. *Oncol Rep* 18, 1311-1314.
- Morey, L., Brenner, C., Fazi, F., Villa, R., Gutierrez, A., Buschbeck, M., Nervi, C., Minucci, S., Fuks, F., and Di Croce, L. (2008). MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol Cell Biol* 28, 5912-5923.
- Morgunkova, A., and Barlev, N. A. (2006). Lysine methylation goes global. *Cell Cycle* 5, 1308-1312.

- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-13329.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9, 769-779.
- Nagl, N. G., Jr., Wang, X., Patsialou, A., Van Scoy, M., and Moran, E. (2007). Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *Embo J* 26, 752-763.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.
- Nakamura, T., Yamazaki, Y., Saiki, Y., Moriyama, M., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (2000). Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 20, 3178-3186.
- Nicoll, G., Crichton, D. N., McDowell, H. E., Kernohan, N., Hupp, T. R., and Thompson, A. M. (2001). Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer. *Br J Cancer* 85, 1878-1882.
- Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S. K., Hartlerode, A., Stegmuller, J., Hafner, A., Loerch, P., *et al.* (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135, 907-918.
- Ohi, H., Mishima, Y., Kamimura, K., Maruyama, M., Sasai, K., and Kominami, R. (2007). Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after gamma-irradiation. *Oncogene* 26, 5280-5289.
- Ohm, J. E., and Baylin, S. B. (2007). Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle* 6, 1040-1043.
- Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K. E., Cope, L., Mohammad, H. P., Chen, W., Daniel, V. C., Yu, W., *et al.* (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 39, 237-242.
- Okazuka, K., Wakabayashi, Y., Kashihara, M., Inoue, J., Sato, T., Yokoyama, M., Aizawa, S., Aizawa, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. (2005). p53 prevents maturation of T cell development to the immature CD4-CD8+ stage in Bcl11b-/- mice. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 545-549.
- Oshiro, A., Tagawa, H., Ohshima, K., Karube, K., Uike, N., Tashiro, Y., Utsunomiya, A., Masuda, M., Takasu, N., Nakamura, S., *et al.* (2006). Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 107, 4500-4507.

- Owerbach, D., McKay, E. M., Yeh, E. T., Gabbay, K. H., and Bohren, K. M. (2005). A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 517-520.
- Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P., and Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19, 123-133.
- Parekh, S., Polo, J. M., Shaknovich, R., Juszczynski, P., Lev, P., Ranuncolo, S. M., Yin, Y., Klein, U., Cattoretti, G., Dalla Favera, R., *et al.* (2007). BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* 110, 2067-2074.
- Parrella, P., Scintu, M., Prencipe, M., Poeta, M. L., Gallo, A. P., Rabitti, C., Rinaldi, M., Tommasi, S., Paradiso, A., Schittulli, F., *et al.* (2005). HIC1 promoter methylation and 17p13.3 allelic loss in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Lett* 222, 75-81.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H. C., 3rd, Nussenzweig, M. C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-112.
- Perry, J. J., Tainer, J. A., and Boddy, M. N. (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33, 201-208.
- Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M., and Zelent, A. (2003). The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem* 278, 16059-16072.
- Phan, R. T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-639.
- Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6, 1054-1060.
- Phan, R. T., Saito, M., Kitagawa, Y., Means, A. R., and Dalla-Favera, R. (2007). Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat Immunol* 8, 1132-1139.
- Pieretti, M., Powell, D. E., Gallion, H. H., Conway, P. S., Case, E. A., and Turker, M. S. (1995). Hypermethylation at a chromosome 17 "hot spot" is a common event in ovarian cancer. *Hum Pathol* 26, 398-401.
- Pilz, D. (2003). Miller-Dieker Syndrome. *Orphanet encyclopedia*, 1-3.
- Pinte, S., Guerardel, C., Deltour-Balerdi, S., Godwin, A. K., and Leprince, D. (2004a). Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1. *Oncogene* 23, 4023-4031.

- Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B. R., Guerardel, C., and Leprince, D. (2004b). The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem* 279, 38313-38324.
- Polo, J. M., Dell'Oso, T., Ranuncolo, S. M., Cerchietti, L., Beck, D., Da Silva, G. F., Prive, G. G., Licht, J. D., and Melnick, A. (2004). Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat Med* 10, 1329-1335.
- Polo, J. M., Juszczynski, P., Monti, S., Cerchietti, L., Ye, K., Grealley, J. M., Shipp, M., and Melnick, A. (2007). Transcriptional signature with differential expression of BCL6 target genes accurately identifies BCL6-dependent diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3207-3212.
- Potente, M., and Dimmeler, S. (2008). NO targets SIRT1 A novel signaling network in endothelial senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1577-1579.
- Przybylski, G. K., Dik, W. A., Wanzeck, J., Grabarczyk, P., Majunke, S., Martin-Subero, J. I., Siebert, R., Dolken, G., Ludwig, W. D., Verhaaf, B., *et al.* (2005). Disruption of the BCL11B gene through inv(14)(q11.2q32.31) results in the expression of BCL11B-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type BCL11B transcripts in T-ALL. *Leukemia* 19, 201-208.
- Pulford, K., Banham, A. H., Lyne, L., Jones, M., Ippolito, G. C., Liu, H., Tucker, P. W., Roncador, G., Lucas, E., Ashe, S., *et al.* (2006). The BCL11AXL transcription factor: its distribution in normal and malignant tissues and use as a marker for plasmacytoid dendritic cells. *Leukemia* 20, 1439-1441.
- Qian, H., Yu, J., Li, Y., Wang, H., Song, C., Zhang, X., Liang, X., Fu, M., and Lin, C. (2007). RNA interference of metastasis-associated gene 1 inhibits metastasis of B16F10 melanoma cells in a C57BL/6 mouse model. *Biol Cell* 99, 573-581.
- Quon, K. C., and Berns, A. (2001). Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev* 15, 2917-2921.
- Racki, L. R., and Narlikar, G. J. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling enzymes: two heads are not better, just different. *Curr Opin Genet Dev* 18, 137-144.
- Ranuncolo, S. M., Polo, J. M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Grealley, J., Green, R., Carroll, M., and Melnick, A. (2007). Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8, 705-714.
- Ranuncolo, S. M., Wang, L., Polo, J. M., Dell'Oso, T., Dierov, J., Gaymes, T. J., Rassool, F., Carroll, M., and Melnick, A. (2008). BCL6-mediated attenuation of DNA damage sensing triggers

- growth arrest and senescence through a p53-dependent pathway in a cell context-dependent manner. *J Biol Chem* *283*, 22565-22572.
- Reisman, D., Glaros, S., and Thompson, E. A. (2009). The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene* *28*, 1653-1668.
- Roberts, C. W., and Orkin, S. H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* *4*, 133-142.
- Roche, A. E., Bassett, B. J., Samant, S. A., Hong, W., Blobel, G. A., and Svensson, E. C. (2008). The zinc finger and C-terminal domains of MTA proteins are required for FOG-2-mediated transcriptional repression via the NuRD complex. *J Mol Cell Cardiol* *44*, 352-360.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* *18*, 6455-6461.
- Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J Virol* *77*, 5415-5427.
- Rood, B. R., Zhang, H., Weitman, D. M., and Cogen, P. H. (2002). Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res* *62*, 3794-3797.
- Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y., Shi, Y., and Gill, G. (2006). NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5308-5313.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* *10*, 831-842.
- Sadoul, K., Boyault, C., Pabion, M., and Khochbin, S. (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* *90*, 306-312.
- Saiki, Y., Yamazaki, Y., Yoshida, M., Katoh, O., and Nakamura, T. (2000). Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. *Genomics* *70*, 387-391.
- Sakata, J., Inoue, J., Ohi, H., Kosugi-Okano, H., Mishima, Y., Hatakeyama, K., Niwa, O., and Kominami, R. (2004). Involvement of V(D)J recombinase in the generation of intragenic deletions in the *Rit1/Bcl11b* tumor suppressor gene in gamma-ray-induced thymic lymphomas and in normal thymus of the mouse. *Carcinogenesis* *25*, 1069-1075.
- Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2009). SIRT1: regulation of longevity via autophagy. *Cell Signal*.
- Sankaran, V. G., Menne, T. F., Xu, J., Akie, T. E., Lettre, G., Van Handel, B., Mikkola, H. K., Hirschhorn, J. N., Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2008). Human fetal hemoglobin expression

- is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 322, 1839-1842.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21, 5206-5215.
- Sasaki, T., Maier, B., Bartke, A., and Scrable, H. (2006). Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging Cell* 5, 413-422.
- Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T. G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E. L., Liu, H., Price, H. P., Gesk, S., Steinemann, D., *et al.* (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98, 3413-3420.
- Saunders, LR, and Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26, 5489-5504.
- Schubel, K., Chen, W., and Baylin, S. B. (2006). CIMP: origin for promoter hypermethylation in colorectal cancer? *Nat Genet* 38, 738-740.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128, 735-745.
- Schultz, D. C., Friedman, J. R., and Rauscher, F. J., 3rd (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev* 15, 428-443.
- Schwartz, Y. B., and Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol* 20, 266-273.
- Sebban, H., Yamaoka, S., and Courtois, G. (2006). Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-kappaB signaling. *Trends Cell Biol* 16, 569-577.
- Senawong, T., Peterson, V. J., Avram, D., Shepherd, D. M., Frye, R. A., Minucci, S., and Leid, M. (2003). Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 278, 43041-43050.
- Senawong, T., Peterson, V. J., and Leid, M. (2005). BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys* 434, 316-325.
- Shalizi, A., Gaudilliere, B., Yuan, Z., Stegmuller, J., Shirogane, T., Ge, Q., Tan, Y., Schulman, B., Harper, J. W., and Bonni, A. (2006). A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311, 1012-1017.

- Shen, Y., Ge, B., Ramachandrareddy, H., McKeithan, T., and Chan, W. C. (2008). Alternative splicing generates a short BCL6 (BCL6S) isoform encoding a compact repressor. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 190-193.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shiio, Y., and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13225-13230.
- Silverstein, R. A., and Ekwall, K. (2005). Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* 47, 1-17.
- Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 19, 629-639.
- Singh, R. R., and Kumar, R. (2007). MTA family of transcriptional metaregulators in mammary gland morphogenesis and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12, 115-125.
- Spengler, M. L., Guo, L. W., and Brattain, M. G. (2008). Phosphorylation mediates Sp1 coupled activities of proteolytic processing, desumoylation and degradation. *Cell Cycle* 7, 623-630.
- Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guerardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007). An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27, 2661-2675.
- Stankovic-Valentin, N., Verger, A., Deltour-Balerdi, S., Quinlan, K. G., Crossley, M., and Leprince, D. (2006). A L225A substitution in the human tumour suppressor HIC1 abolishes its interaction with the corepressor CtBP. *Febs J* 273, 2879-2890.
- Stehmeier, P., and Muller, S. (2009). Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. *DNA Repair (Amst)* 8, 491-498.
- Stewart, M. D., Li, J., and Wong, J. (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol* 25, 2525-2538.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Kruger, I., and Suske, G. (2008). SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* 9, 899-906.
- Stocklein, H., Smardova, J., Macak, J., Katzenberger, T., Holler, S., Wessendorf, S., Hutter, G., Dreyling, M., Haralambieva, E., Mader, U., *et al.* (2008). Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 27, 2613-2625.

- Sun, G., Liu, X., Mercado, P., Jenkinson, S.R., Kyriotou, M., Feigenbaum, L., Galéra, P., and Bosselut R. (2005). The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nat Immunol* 4, 373-381.
- Sun, H., Levenson, J. D., and Hunter, T. (2007). Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *Embo J* 26, 4102-4112.
- Suzuki, H., Kurita, M., Mizumoto, K., Moriyama, M., Aiso, S., Nishimoto, I., and Matsuoka, M. (2005). The ARF tumor suppressor inhibits BCL6-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 242-248.
- Tatemichi, M., Hata, H., Tazawa, H., and Nakadate, T. (2008). Lipopolysaccharide induces aberrant hypermethylation of Hic-1 in mouse embryonic fibroblasts lacking p53 gene. *Anticancer Res* 28, 2101-2108.
- Tatham, M. H., Geoffroy, M. C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E. G., Palvimo, J. J., and Hay, R. T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10, 538-546.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.
- Tempe, D., Piechaczyk, M., and Bossis, G. (2008). SUMO under stress. *Biochem Soc Trans* 36, 874-878.
- Thelen, M., and Thelen, S. (2008). CXCR7, CXCR4, and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198, 9-13.
- Ting, A. H., McGarvey, K. M., and Baylin, S. B. (2006). The cancer epigenome--components and functional correlates. *Genes Dev* 20, 3215-3231.
- Toh, Y., Kuwano, H., Mori, M., Nicolson, G. L., and Sugimachi, K. (1999). Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive oesophageal carcinomas. *Br J Cancer* 79, 1723-1726.
- Toh, Y., and Nicolson, G. L. (2009). The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications. *Clin Exp Metastasis* 26, 215-227.
- Toh, Y., Pencil, S. D., and Nicolson, G. L. (1994). A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem* 269, 22958-22963.
- Tomar, R. S., Psathas, J. N., Zhang, H., Zhang, Z., and Reese, J. C. (2009). A novel mechanism of antagonism between ATP-dependent chromatin remodeling complexes regulates RNR3 expression. *Mol Cell Biol*.

- Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V. J., Barrett, B., Jr., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T. M., and Leid, M. (2006). CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. *J Biol Chem* 281, 32272-32283.
- Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragon, L., and Lisby, M. (2007). The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* 9, 923-931.
- Tydell, C. C., David-Fung, E. S., Moore, J. E., Rowen, L., Taghon, T., and Rothenberg, E. V. (2007). Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway. *J Immunol* 179, 421-438.
- Uchimura, Y., Ichimura, T., Uwada, J., Tachibana, T., Sugahara, S., Nakao, M., and Saitoh, H. (2006). Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation. *J Biol Chem* 281, 23180-23190.
- Ulrich, H. D. (2005). Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 15, 525-532.
- Ulrich, H. D. (2008). The fast-growing business of SUMO chains. *Mol Cell* 32, 301-305.
- Ulrich, H. D., Vogel, S., and Davies, A. A. (2005). SUMO keeps a check on recombination during DNA replication. *Cell Cycle* 4, 1699-1702.
- Vaissiere, T., Sawan, C., and Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 659, 40-48.
- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafilek, B., and Korinek, V. (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *Embo J* 25, 2326-2337.
- Valin, A., and Gill, G. (2007). Regulation of the dual-function transcription factor Sp3 by SUMO. *Biochem Soc Trans* 35, 1393-1396.
- van Oevelen, C., Wang, J., Asp, P., Yan, Q., Kaelin, W. G., Jr., Kluger, Y., and Dynlacht, B. D. (2008). A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing. *Mol Cell* 32, 359-370.
- Vandercappellen, J., Van Damme, J., and Struyf, S. (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 267, 226-244.
- Vanhatupa, S., Ungureanu, D., Paakkunainen, M., and Silvennoinen, O. (2008). MAPK-induced Ser727 phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem J* 409, 179-185.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 16, 93-105.

- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., and Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* *450*, 440-444.
- Vatsyayan, J., Qing, G., Xiao, G., and Hu, J. (2008). SUMO1 modification of NF-kappaB2/p100 is essential for stimuli-induced p100 phosphorylation and processing. *EMBO Rep* *9*, 885-890.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* *4*, 137-142.
- Vermeer, M. H., van Doorn, R., Dijkman, R., Mao, X., Whittaker, S., van Voorst Vader, P. C., Gerritsen, M. J., Geerts, M. L., Gellrich, S., Soderberg, O., *et al.* (2008). Novel and highly recurrent chromosomal alterations in Sezary syndrome. *Cancer Res* *68*, 2689-2698.
- Verstappen, G., van Grunsven, L. A., Michiels, C., Van de Putte, T., Souopgui, J., Van Damme, J., Bellefroid, E., Vandekerckhove, J., and Huylebroeck, D. (2008). Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFHX1B/SIP1 and NuRD corepressor complex. *Hum Mol Genet* *17*, 1175-1183.
- Waha, A., Koch, A., Hartmann, W., Mack, H., Schramm, J., Sorensen, N., Berthold, F., Wiestler, O. D., Pietsch, T., and Waha, A. (2004). Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas. *Int J Cancer* *110*, 542-549.
- Wakabayashi, Y., Inoue, J., Takahashi, Y., Matsuki, A., Kosugi-Okano, H., Shinbo, T., Mishima, Y., Niwa, O., and Kominami, R. (2003a). Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* *301*, 598-603.
- Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., *et al.* (2003b). Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol* *4*, 533-539.
- Wales, M. M., Biel, M. A., el Deiry, W., Nelkin, B. D., Issa, J. P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., and Baylin, S. B. (1995). p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* *1*, 570-577.
- Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W. D., and Chen, J. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* *8*, 1025-1031.
- Wang, C. Y., Yang, P., Li, M., and Gong, F. (2009). Characterization of a negative feedback network between SUMO4 expression and NFkappaB transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* *381*, 477-481.
- Wang, D., Long, J., Dai, F., Liang, M., Feng, X. H., and Lin, X. (2008a). BCL6 represses Smad signaling in transforming growth factor-beta resistance. *Cancer Res* *68*, 783-789.

- Wang, H. B., and Zhang, Y. (2001). Mi2, an auto-antigen for dermatomyositis, is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Nucleic Acids Res* 29, 2517-2521.
- Wang, L., Charroux, B., Kerridge, S., and Tsai, C. C. (2008b). Atrophin recruits HDAC1/2 and G9a to modify histone H3K9 and to determine cell fates. *EMBO Rep* 9, 555-562.
- Weniger, M. A., Pulford, K., Gesk, S., Ehrlich, S., Banham, A. H., Lyne, L., Martin-Subero, J. I., Siebert, R., Dyer, M. J., Moller, P., and Barth, T. F. (2006). Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20, 1880-1882.
- Whittle, J. R., Powell, M. J., Popov, V. M., Shirley, L. A., Wang, C., and Pestell, R. G. (2007). Sirtuins, nuclear hormone receptor acetylation and transcriptional regulation. *Trends Endocrinol Metab* 18, 356-364.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D. J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., and Laird, P. W. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39, 157-158.
- Wolffe, A. P., and Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286, 481-486.
- Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S., and Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311, 1141-1146.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., *et al.* (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J., and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* 2, 851-861.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., and Kikuchi, A. (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J* 22, 2047-2059.
- Yang, S. H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A. D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *Embo J* 25, 5083-5093.
- Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12, 63-74.
- Yang, W. H., Heaton, J. H., Brevig, H., Mukherjee, S., Iniguez-Lluhi, J. A., and Hammer, G. D. (2009). SUMOylation inhibits SF-1 activity by reducing CDK7-mediated serine 203 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29, 613-625.
- Yang, X. J., and Gregoire, S. (2006). A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23, 779-786.

- Yang, X. J., and Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* *31*, 449-461.
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S. V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007). SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* *9*, 1253-1262.
- Yao, Y. L., and Yang, W. M. (2003). The metastasis-associated proteins 1 and 2 form distinct protein complexes with histone deacetylase activity. *J Biol Chem* *278*, 42560-42568.
- Yin, B., Delwel, R., Valk, P. J., Wallace, M. R., Loh, M. L., Shannon, K. M., and Largaespada, D. A. (2009). A retroviral mutagenesis screen reveals strong cooperation between Bcl11a overexpression and loss of the Nf1 tumor suppressor gene. *Blood* *113*, 1075-1085.
- Yoo, Y. G., Kong, G., and Lee, M. O. (2006). Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1. *Embo J* *25*, 1231-1241.
- Yoshikai, Y., Sato, T., Morita, S., Kohara, Y., Takagi, R., Mishima, Y., and Kominami, R. (2008). Effect of Bcl11b genotypes and gamma-radiation on the development of mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* *373*, 282-285.
- Zhang, B., Chambers, K. J., Leprince, D., Faller, D. V., and Wang, S. (2009). Requirement for chromatin-remodeling complex in novel tumor suppressor HIC1-mediated transcriptional repression and growth control. *Oncogene* *28*, 651-661.
- Zhang, F. P., Mikkonen, L., Toppari, J., Palvimo, J. J., Thesleff, I., and Janne, O. A. (2008). Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* *28*, 5381-5390.
- Zhang, Q., Wang, S. Y., Fleuriel, C., Leprince, D., Rocheleau, J. V., Piston, D. W., and Goodman, R. H. (2007). Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 829-833.
- Zhang, Q., Wang, S. Y., Nottke, A. C., Rocheleau, J. V., Piston, D. W., and Goodman, R. H. (2006). Redox sensor CtBP mediates hypoxia-induced tumor cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9029-9033.
- Zhang, X. Y., DeSalle, L. M., Patel, J. H., Capobianco, A. J., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., and McMahon, S. B. (2005). Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is an essential downstream effector of the c-MYC oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13968-13973.
- Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S., and Reinberg, D. (1998). The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* *95*, 279-289.

- Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935.
- Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T. A., Evans, R. M., and Yao, T. P. (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25, 8456-8464.
- Zhu, Q., Zhang, J. W., Zhu, H. Q., Shen, Y. L., Flexor, M., Jia, P. M., Yu, Y., Cai, X., Waxman, S., Lanotte, M., *et al.* (2002). Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 99, 1014-1022.
- Zimnik, S., Gaestel, M., and Niedenthal, R. (2009). Mutually exclusive STAT1 modifications identified by Ubc9/substrate dimerization-dependent SUMOylation. *Nucleic Acids Res* 37, e30.

ANNEXES

I. Publication n°4

Metabolic régulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex

Qinghong ZHANG, Su-Yan WANG, Capucine FLEURIEL, Dominique LEPRINCE, Jonathan V. ROCHELEAU, David W. PISTON, et Richard H. GOODMAN.
PNAS (2007), *104*, 829-833.

Nous avons participé à cette étude effectuée par l'équipe de Richard Goodman (Oregon Health and Science University, Portland, USA), qui porte sur la régulation métabolique de l'interaction entre HIC1 et CtBP, notamment au niveau du promoteur de *SIRT1*.

Cet article décrit le mécanisme de recrutement par HIC1 de CtBP, corépresseur identifié auparavant au sein de notre équipe (Deltour et al., 2002 ; Stankovis-Valentin et al., 2007).

Les protéines CtBP ont été décrites pour être régulées par le NADH, en particulier lors d'un travail précédent effectué par cette même équipe. En effet, cette molécule permet leur dimérisation, nécessaire à leur fonctionnement, notamment dans le rôle de la migration des cellules tumorales suite à l'hypoxie (Zhang et al., 2006).

Dans la présente étude, il est montré que l'addition de 2-DG (2-désoxyglucose), qui permet de bloquer la glycolyse, donc qui diminue le taux de NADH libre au sein de la cellule, entraîne la dissociation du couple CtBP-HIC1. Ceci a lieu en particulier dans le contexte de la régulation de la transcription du gène *SIRT1*, ce qui a pour effet l'augmentation de sa transcription et son accumulation protéique.

Cet article identifie donc l'un des mécanismes par lequel le membre fondateur des sirtuines chez les mammifères, SIRT1, est régulé par le métabolisme.

Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex

Qinghong Zhang^{*†}, Su-Yan Wang^{*}, Capucine Fleuriel[‡], Dominique Leprince[‡], Jonathan V. Rocheleau[§], David W. Piston[§], and Richard H. Goodman^{*†}

^{*}Vollum Institute, Oregon Health and Science University, 3181 Southwest Sam Jackson Park Road, Portland, OR 97239; [†]Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8161, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France; and [‡]Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University, 702 Light Hall, Nashville, TN 37232

Contributed by Richard H. Goodman, November 29, 2006 (sent for review November 9, 2006)

The Sir2 histone deacetylases are important for gene regulation, metabolism, and longevity. A unique feature of these enzymes is their utilization of NAD⁺ as a cosubstrate, which has led to the suggestion that Sir2 activity reflects the cellular energy state. We show that SIRT1, a mammalian Sir2 homologue, is also controlled at the transcriptional level through a mechanism that is specific for this isoform. Treatment with the glycolytic blocker 2-deoxyglucose (2-DG) decreases association of the redox sensor CtBP with HIC1, an inhibitor of SIRT1 transcription. We propose that the reduction in transcriptional repression mediated by HIC1, due to the decrease of CtBP binding, increases SIRT1 expression. This mechanism allows the specific regulation of SIRT1 in response to nutrient deprivation.

redox | NAD⁺ | NADH

Sir2 enzymes, collectively called sirtuins, have been linked to aging and age-related diseases including cancer, diabetes, and neurodegenerative disorders. These enzymes are unique among histone deacetylases in that they require NAD⁺ as a cosubstrate (1). As such, their activity has been postulated to respond to changes in cellular metabolism (2–4). Although it was initially proposed that calorie restriction stimulates Sir2 activity and extends lifespan in yeast by increasing NAD⁺ levels (2, 5, 6), other regulators of Sir2 enzyme activity, such as nicotinamide, have also been suggested (7). In metazoan systems, regulation may additionally occur at the level of Sir2 expression. In *Drosophila*, for example, the extension of lifespan induced by calorie restriction is associated with an increase in Sir2 mRNA, suggesting that regulation occurs, at least in part, at the level of Sir2 transcription (8). In addition, both calorie restriction and fasting have been found to cause a substantial increase in levels of the Sir2 homologue, SIRT1, in brain, fat, and liver of intact rodents (9, 10). Mechanisms underlying the transcriptional regulation of Sir2 isoforms are poorly understood.

Another nuclear protein involved in metabolic sensing, the transcriptional corepressor CtBP, has also been proposed to be regulated by nicotinamide adenine dinucleotides (11). CtBP, so named because it was initially characterized as the adenovirus E1A carboxyl terminus binding protein, participates in a wide variety of transcriptional pathways (for review, see ref. 12). In contrast to Sir2, CtBP is affected by both NAD⁺ and NADH (11, 13, 14). Although free NAD⁺ (presumably the relevant fraction for Sir2 regulation) cannot be measured directly, the ratio of cytoplasmic free NAD⁺:NADH can be derived from the lactate and pyruvate concentrations (15). Under resting conditions, this ratio is ≈ 600 – 700 , indicating that free NAD⁺ levels greatly exceed those of NADH. Because the free nicotinamide adenine dinucleotides should readily pass through the nuclear membrane, this ratio should be the same within the nuclear compartment. The concentration of free NADH in the nucleus is ≈ 100 nM, as determined by using two-photon fluorescence microscopy (11). Combining the experimentally determined value for NADH with the ratio of nicotinamide adenine dinucleotides derived from the lactate:pyruvate ratio, one can estimate

the free NAD⁺ to be ≈ 70 μ M, a value reasonably close to the K_m for Hst2, a cytoplasmic Sir2 isoform (16). Thus, although the concentration of free NAD⁺ in the nucleus is appropriate for it to serve as a regulator of Sir2 enzyme activity, the high NAD⁺:NADH ratio in resting cells suggests that free NAD⁺ levels remain fairly constant. Consequently, NAD⁺ may only serve as a Sir2 regulator under certain circumstances, such as DNA damage, which stimulates poly(ADP-ribose) polymerase activity and thereby reduces NAD⁺ levels (17). If Sir2 responds to changes in cellular metabolism, it is likely to be through other mediators.

In this report, we show that nutrient deprivation specifically regulates one mammalian Sir2 isoform, SIRT1, through the redox-sensing ability of the transcriptional corepressor, CtBP. CtBP has previously been shown to mediate the hypoxia-induced repression of E-cadherin (18). We show here that the redox changes induced by the glycolytic inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG) decrease CtBP interaction with the transcriptional repressor, HIC1 (hypermethylated in cancer; 19). Because HIC1 binds to the SIRT1 promoter (20), the consequent reduction of CtBP recruitment decreases transcriptional repression and induces SIRT1 expression. Thus, although SIRT1 uses NAD⁺ as a substrate, its metabolic regulation in response to 2-DG occurs, at least in part, at the level of transcription via the redox sensor CtBP. This mechanism allows the dynamic and specific regulation of SIRT1 in response to acute metabolic changes.

Results

2-DG is commonly used to block glycolysis in cell culture models. We consequently asked whether this agent affected glycolysis in primary human fibroblasts (CCD) as monitored by measurement of the lactate:pyruvate ratio and nuclear NAD(P)H fluorescence. The levels of pyruvate and lactate were measured as described by Williamson *et al.* (15), taking care to analyze the samples immediately after harvesting. Treatment with 10 mM 2-DG decreased the lactate:pyruvate ratio by 2.6-fold (Fig. 1A). This ratio was used to calculate the NAD⁺:NADH ratio according to the following equation: $\text{NAD}^+:\text{NADH} = (\text{pyruvate})(\text{H}^+)/(\text{lactate})K$, where K is the equilibrium constant for lactate dehydrogenase. Because there is no barrier to the diffusion of free nicotinamide adenine dinucleotides between the cytoplasmic and nuclear compartments, these measurements should also reflect the free nuclear

Author contributions: Q.Z. and R.H.G. designed research; Q.Z., S.-Y.W., and J.V.R. performed research; Q.Z., D.W.P., and R.H.G. analyzed data; C.F., D.L., and D.W.P. contributed new reagents/analytic tools; and Q.Z. and R.H.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: 2-DG, 2-deoxyglucose; MEF, mouse embryonic fibroblasts; HIC1, hypermethylated in cancer.

[†]To whom correspondence may be addressed at: Vollum Institute, L474, Oregon Health and Science University, 3181 Southwest Sam Jackson Park Road, Portland, OR 97239. E-mail: zhangq@ohsu.edu or goodmanr@ohsu.edu.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

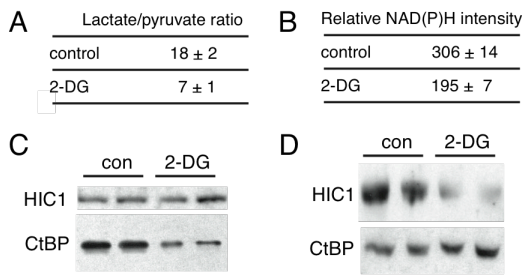


Fig. 1. 2-DG decreases free NADH levels and reduces CtBP binding to HIC1. (A) 2-DG changes the cellular lactate:pyruvate ratio. Primary human fibroblasts were treated with 10 mM 2-DG and the pyruvate and lactate concentrations were determined as described (15). (B) 2-DG decreases nuclear NAD(P)H levels. Two-photon fluorescence measurement of the nuclear NAD(P)H intensity of control and 2-DG-treated fibroblasts is shown. (C) 2-DG blocks the CtBP-HIC1 interaction. CtBP1 and FLAG-tagged HIC1 were transfected into Cos7 cells. Cells were treated with 2-DG before immunoprecipitation with anti-FLAG antibody. CtBP1 associated with HIC1 was assayed by Western blotting. con, control. (D) Interaction of endogenous CtBP and HIC1 is prevented by 2-DG treatment. Human primary fibroblasts were treated with 2-DG and immunoprecipitated with an antibody directed against CtBP. The associated HIC1 was assayed by Western blotting.

NAD⁺:NADH ratio. Control cells had an NAD⁺:NADH ratio of 550. After treatment with 2-DG, this ratio increased to 1,430. Therefore, assuming that the NAD⁺ concentration remains relatively constant, the free NADH concentration should decrease by 2.6-fold after 2-DG treatment. To confirm this, we used two-photon fluorescence microscopy. The intensity of the nuclear NAD(P)H fluorescence (the sum of the NADH and NADPH signals) decreased by ≈40% upon 2-DG treatment (Fig. 1*B*). Previous studies have shown that NADH constitutes about a third of the NAD(P)H signal under resting conditions (21) and that 2-DG only minimally decreases the NADPH component (22). Thus, the 40% reduction in total NAD(P)H signal represents a decrease in free NADH that is consistent with the pyruvate and lactate measurements. We conclude from these studies that 2-DG effectively changes the redox status of primary CCD fibroblasts.

SIRT1 transcription is repressed by HIC1 (20), whose function depends in part on its interaction with the corepressor, CtBP (23). We reasoned, therefore, that conditions that decreased the association of HIC1 with CtBP would decrease the HIC1-mediated repression, hence increasing SIRT1 expression. To assess whether 2-DG affected CtBP binding to HIC1, we performed coimmunoprecipitation assays. Under control conditions, the association of HIC1 and CtBP was readily apparent (Fig. 1*C*, IP with HIC1; Fig. 1*D*, IP with CtBP). In cells treated with 2-DG, the HIC1 interaction with CtBP was markedly decreased. To rule out other effects of 2-DG (24), we treated cells with pyruvate, which similarly reduces free NADH levels (18), and obtained identical results (data not shown).

According to our model, CtBP recruitment to the SIRT1 promoter occurs through HIC1 (20). To assess whether 2-DG affects CtBP binding to the SIRT1 promoter, we performed ChIP assays (Fig. 2*A*). 2-DG markedly decreased CtBP recruitment, and this change was accompanied by an increase in SIRT1 transcript levels (Fig. 2*B*) and SIRT1 protein (Fig. 2*C*). Thus, we suggest that 2-DG regulates SIRT1 expression by reducing HIC1 binding to CtBP.

HIC1 levels are relatively low in transformed cells (25), which allowed us to assess its involvement in the SIRT1 response to 2-DG. Fig. 3*A* compares HIC1 levels in primary CCD fibroblasts and H1299 lung carcinoma cells. The relative lack of HIC1 in H1299 cells is associated with a corresponding reduction in the

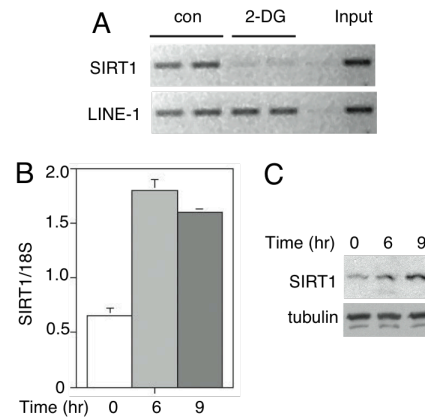


Fig. 2. 2-DG decreases CtBP recruitment to the SIRT1 promoter and increases SIRT1 expression. (A) CtBP recruitment to the SIRT1 promoter is blocked by 2-DG. Human primary fibroblasts were treated with 2-DG for 3 h, and ChIP was performed with antibodies directed against CtBP. Recruitment of CtBP to the HIC1-binding sites on the SIRT1 promoter was assayed by PCR. LINE-1 served as nonspecific control. (B) 2-DG increases SIRT1 transcript levels. Primary human fibroblasts were treated with 2-DG for 6 or 9 h, and the SIRT1 transcript was measured by RT-PCR. Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean ± SEM from three independent experiments. (C) 2-DG increases SIRT1 protein levels. Primary human fibroblasts were treated with 2-DG for 6 or 9 h, and SIRT1 protein was assayed by Western blotting. Tubulin served as a loading control.

SIRT1 response to 2-DG (Fig. 3*A Right*). To confirm that this lack of response was due to the absence of HIC1, we transfected H1299 cells with a HIC1 expression vector (23). Addition of HIC1 reduced SIRT1 transcript levels and restored the response to 2-DG (Fig. 3*B Left*). We also tested a mutant HIC1 that lacked

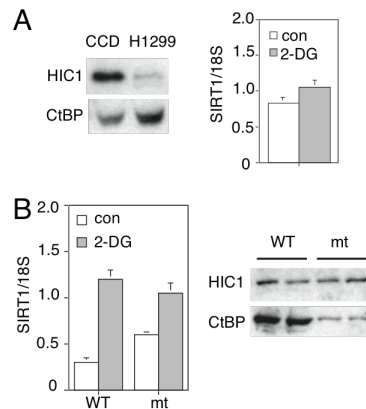


Fig. 3. HIC1 is required for the transcriptional regulation of SIRT1 by 2-DG. (A) Decreased HIC1 levels in tumor cells are associated with loss of 2-DG-induced SIRT1 up-regulation. Human lung cancer cells (H1299) and primary human fibroblasts (CCD) were treated with 2-DG. Western blot (Left) shows the HIC1 and CtBP levels. SIRT1 RNA levels were measured by RT-PCR (Right). Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean ± SEM from three independent experiments. (B) HIC1 rescues the 2-DG-induced SIRT1 up-regulation in tumor cells. H1299 lung cancer cells were transfected with HIC1, either WT or the GLDLSKK-deleted (mt) version, and treated with 2-DG. SIRT1 RNA was measured by RT-PCR and normalized to 18S RNA (Left). Data are represented as mean ± SEM from three independent experiments. Western blot shows the decreased binding of CtBP to the HIC1 GLDLSKK-deletion mutant compared with the WT (Right).

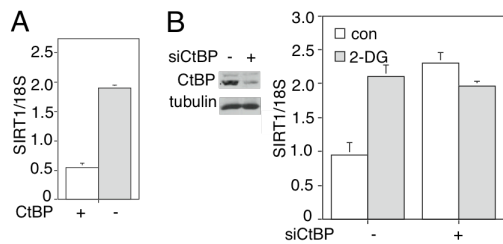


Fig. 4. CtBP is required for the transcriptional regulation of SIRT1 by 2-DG. (A) Increased levels of SIRT1 transcript in CtBP-null MEFs. SIRT1 transcription in CtBP-null and heterozygous MEFs was measured by RT-PCR. Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean \pm SEM from three independent experiments. (B) CtBP knockdown in primary human fibroblasts up-regulates SIRT1 transcription. (Left) CtBP and -2 in human fibroblasts were knocked down by siRNA. (Right) Cells treated with siRNA (or control) were exposed to 2-DG before measurement of SIRT1 transcript levels. Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean \pm SEM from three independent experiments. con, control.

the putative CtBP interaction motif (23). (The difference in CtBP binding between the WT and mutant HIC1 proteins is shown in Fig. 3B Right). Addition of the mutant HIC1 resulted in a higher basal SIRT1 level and a smaller response to 2-DG, supporting the proposed roles of HIC1 and CtBP in SIRT1 transcriptional control.

To directly test the contribution of CtBP in SIRT1 regulation, we examined mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from CtBP knockout mice (26). SIRT1 transcript levels were increased in the knockout line as compared with similar cells from heterozygotes (Fig. 4A). We also tested an siRNA capable of knocking down CtBP1 and CtBP2 (27) (Fig. 4B Left). Knockdown of CtBP in HIC1-containing primary CCD cells elevated SIRT1 levels and blocked the response to 2-DG (Fig. 4B Right). Taken together, these studies confirm the roles of HIC1 and CtBP in SIRT1 expression.

Next, we tested whether SIRT1 transcription is regulated in the opposite direction through hypoxia, which increases NADH concentration by \approx 4-fold (18). Overnight exposure of cells to hypoxia (1% O₂) lowered levels of SIRT1 transcript (Fig. 5A). This effect was partially blocked by treatment with pyruvate, which drives NADH to NAD⁺ (18). A complete reversal of the hypoxia effect occurred after treatment with 2-DG. Interestingly, 2-DG treatment specifically induced the expression of SIRT1 but not the other mammalian Sir2 isoforms (Fig. 5B).

Discussion

Nicotinamide adenine dinucleotides derive their biological functions by regulating NAD⁺/NADH-dependent enzymes, such as the dehydrogenases and reductases, and by serving as substrates for the poly(ADP-ribose) polymerases, which have recently been linked to transcriptional control (28) in addition to their well known role in DNA repair. The involvement of NAD⁺ in sirtuin regulation and NADH in CtBP function provide two additional examples of nicotinamide adenine dinucleotide control of gene expression. The idea that NAD⁺ and NADH can serve as second messengers in gene regulation pathways has stimulated interest in this possible link between energy metabolism and cellular functions.

The requirement for NAD⁺ as a cosubstrate (1) has suggested that sirtuin activity is regulated by changes in cellular metabolism. According to this model, calorie restriction increases NAD⁺ levels, which activates Sir2 function and leads to the deacetylation of critical protein targets (29). This idea does not consider the compartmentalization of nicotinamide adenine dinucleotides, the fact that much of the NAD⁺ and NADH is

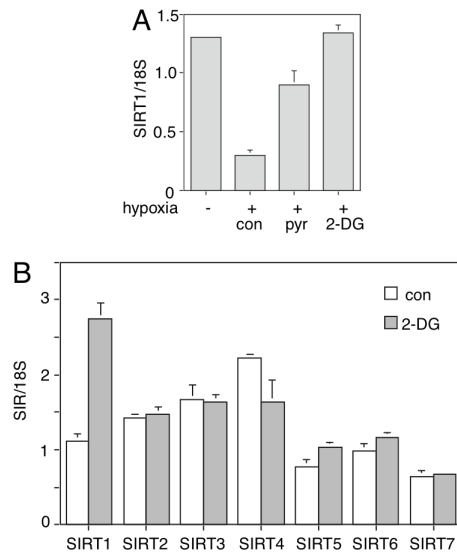


Fig. 5. SIRT1 regulation by hypoxia and 2-DG. (A) Hypoxia decreases SIRT1 transcription. Primary human fibroblasts were treated overnight with hypoxia (1% O₂) alone or in combination with 30 mM pyruvate (pyr) or 10 mM 2-DG. SIRT1 transcripts were measured by RT-PCR. Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean \pm SEM from three independent experiments. con, control. (B) 2-DG specifically increases SIRT1 transcript levels. Primary human fibroblasts were treated with 2-DG for 6 h, and SIRT1–7 transcripts were measured by RT-PCR. Data were normalized to 18S RNA and are represented as mean \pm SEM from three independent experiments.

bound to protein and thereby incapable of participating in Sir2 regulation, or the vast excess of free NAD⁺ over NADH. The latter observation, in particular, predicts that the interconversion of NADH and NAD⁺ causes large changes in free NADH levels but has little effect on free NAD⁺. Thus, even though the free NAD⁺ concentration is near the K_m for Sir2, the magnitude of the NAD⁺ changes may be too small to affect Sir2 function significantly.

In contrast, free NADH may be better suited to serve as a Sir2 regulator, especially under acute conditions. Although this model has been proposed (4), the NADH level required to inhibit Sir2 *in vitro* is considerably higher than that its free nuclear concentration. Interestingly, the concentration of free nuclear NADH is approximately the same as the level required for stimulating half-maximal binding of CtBP to associated proteins (11). One explanation for our findings, therefore, is that the reduction in free nuclear NADH caused by 2-DG treatment decreases association of CtBP with HIC1. The resultant reduction in HIC1-mediated repression could then increase SIRT1 transcription (see Fig. 6). Hypoxia, which increases free nuclear NADH levels, changes SIRT1 transcription in the opposite direction, consistent with the observation that this stimulus, and the consequent increase in free NADH, increases recruitment of the CtBP corepressor. Currently, we cannot determine definitively whether the changes in NADH directly alter CtBP function or whether they reflect some other aspect of cellular redox state. For example, it is possible that redox changes induced by 2-DG other than the decrease in NADH lead to posttranslational modifications in CtBP that affect its association with HIC1 and potentially other binding proteins (Fig. 6). Experiments are currently in progress to examine this possibility. Nonetheless, the ability of pyruvate or 2-DG treatment to block the effect of hypoxia on SIRT1 transcription supports the idea that the

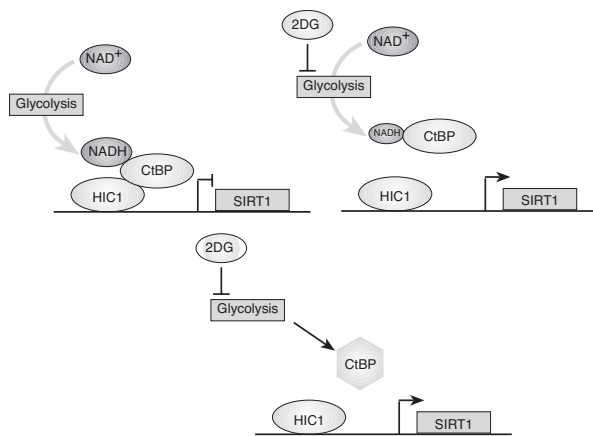


Fig. 6. Models for CtBP-regulation of SIRT1 expression. (Upper) The reduction in free nuclear NADH after 2-DG treatment (designated by the smaller oval representing NADH) decreases CtBP association with HIC1, thus increasing SIRT1 transcription. (Lower) Posttranslational modification of CtBP induced by the block in glycolysis prevents association with HIC1.

redox-sensing ability of CtBP plays an important role in SIRT1 transcriptional regulation.

Notably, our findings differ somewhat from those of Rodgers *et al.* (10). Rodgers *et al.* report an increase in SIRT1 protein, but not mRNA, in the livers of fasted mice. Our studies indicate that both SIRT1 mRNA and protein are induced by 2-DG treatment. This discrepancy may be due to differences between our cell culture model and their use of intact animals or differences between 2-DG treatment and fasting. Rodgers *et al.* also monitor the total nicotinamide adenine dinucleotide concentrations, whereas we consider only the free components. Several studies suggest that the free nicotinamide adenine dinucleotide pool might be more meaningful for regulation of cellular, and particularly transcriptional, proteins. As mentioned above, the estimated concentration of free nuclear NAD⁺ is reasonably close to the K_m for the cytoplasmic Sir2 isoform, Hst2 (16). The K_m values for several of the other sirtuins are also in this range (30), supporting the idea that the free, rather than total, NAD⁺ is most relevant for sirtuin function. Similarly, detailed studies of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, an enzyme structurally related to CtBP, have shown that the binding constants for NAD⁺ and NADH are 64 μ M and 40 nM, respectively, implying that this enzyme also senses the free, rather than total nicotinamide adenine dinucleotide pool (31). Other dehydrogenases and reductases (i.e., lactate dehydrogenase and L- α -glycerophosphate dehydrogenase) have similar properties (32, 33), as does poly(ADP-ribose) polymerase (K_m for NAD⁺ = 59 μ M; 34). In addition, Garriga-Canut *et al.* (35) have reported that the neuron-restrictive silencer factor–CtBP interaction is disrupted by 100 nM NADH, and Zheng *et al.* (36) determined that the concentration of NAD⁺ capable of activating OCA-B-dependent transcription *in vitro* is 100 μ M.

The various Sir2 isoforms have distinct biological properties (37–42), but little is known about their transcriptional control. Unlike the regulation of enzyme activity through NAD⁺, which would affect all Sir2 isoforms, the transcriptional mechanism that we have proposed is specific for SIRT1. Thus, by using the HIC1–CtBP pathway, nutrient deprivation, as induced by 2-DG, is able to signal to a specific histone deacetylase isoform. Evidence for transcriptional regulation of sirtuins has been described previously, but this report provides the first description of how this regulation is achieved. How this mechanism relates to more chronic changes in nutrient availability is not known. Elevated levels of Sir2 in yeast

cause lifetime extension, but it is not clear how this process relates to the mechanisms underlying lifetime extension in other organisms. Similarly, in metazoan systems, evidence suggests that calorie restriction is associated with lifespan extension, but the role of Sir2 is controversial (43).

Finally, it should be acknowledged that regulation at the level of transcription is somewhat unusual as a mechanism for controlling enzyme activity. The existence of enzyme haploinsufficiency disorders, as well as the clear dosage effects of Sir2 itself in several experimental systems (44, 45), support the idea that alterations in enzyme concentration can have important consequences, however. Moreover, many enzymes (particularly those involved in transcriptional regulation, such as Sir2) function within multiprotein complexes (46). Changes in their levels, as opposed to their specific activities, can affect the functions of associated proteins and thereby influence multiple biological processes.

Methods

Chemicals and Reagents. 2-DG, pyruvate, lactate, lactate dehydrogenase, anti-FLAG M2 matrix, and anti- α -tubulin antibody were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Anti-CtBP antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and Upstate Biotechnologies (Lake Placid, NY). Anti-HIC1 antibody was described by Deltour *et al.* (23).

Plasmids. HIC1 expression vectors were described by Deltour *et al.* (23). siRNA oligonucleotides for CtBP (5'-GGG AGG ACC UGG AGA AGU UdTdG / dGdTCCC UCC UGG ACC UCU UCAA-5') were from Dharmacon Research (Boulder, CO). Scramble II Duplex was used as control.

Cell Culture. The H1299 human non-small cell lung cancer cell line, CCD human primary fibroblasts, and MEFs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 10% FCS (HyClone, Logan, UT) and antibiotics (Invitrogen). Incubation was at 37°C under 5% CO₂ in air. The hypoxia chamber (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) has been described (11). CCD cells were transfected with 100 nM oligonucleotides and, 3 days later, the expression of human CtBP was assayed by Western blotting using an anti-CtBP antibody.

Coimmunoprecipitation and Western Blot Analysis. Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate including proteinase inhibitors (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Lysates were centrifuged at 13,000 \times g for 20 min at 4°C, and the supernatants were immunoprecipitated by anti-FLAG or anti-CtBP antibodies and then separated by SDS/PAGE (8% acrylamide) and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked in Tris-buffered saline with 0.2% Tween 20 (TBST; 0.2 mol/liter NaCl, 10 mmol/liter Tris, pH 7.4, 0.2% Tween-20) containing 5% nonfat dry milk and 0.02% NaN₃ for 1 h, then incubated with antibodies against HIC1, CtBP, or α -tubulin in TBST containing 1% nonfat dry milk. The membranes were then incubated with goat anti-rabbit (for HIC1 and CtBP) or goat anti-mouse (for α -tubulin) immunoglobulin (Bio-Rad, Hercules, CA) in TBST containing 1% nonfat dry milk. Bound antibodies were detected with an enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

RT-PCR. RNA was extracted by using an RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA treated with DNase I (Ambion, Austin, TX) was used for reverse transcription. RNA was incubated with oligo(dT) primers (Invitrogen) and 1 mM dNTPs at 65°C for 5 min, cooled on ice, then incubated with 10 mM DTT, 5 \times buffer, and RNasin (Promega, Madison, WI) RNase inhibitor at 42°C for 2 min. Reverse transcription was performed by using Super

transcript II (Invitrogen) at 42°C for 50 min. Reverse transcriptase was inactivated at 70°C for 15 min, and the product was treated with RNase A at 37°C for 30 min before PCR amplification. Real-time PCR was used to quantify the reverse-transcribed products.

ChIP Assays. CCD cells were treated with 2-DG (10 mM) for 3 h. ChIP assays (47) were performed by using an anti-CtBP antibody (Santa Cruz). Primers surrounding the HIC1-binding sites on SirT1 promoter (20) were used to PCR-amplify the ChIP sample. Human LINE1 serves as nonspecific control.

Determination of NAD⁺:NADH Ratio. Cells were quickly deproteinized in 200 μ l of acid extraction buffer (1N HClO₃) and neutralized with 100 μ l of 2 M KHCO₃. The concentrations of the metabolic intermediates were measured after an enzymatic cycling reaction using 10 μ l of sample. The free cytoplasmic NAD⁺:NADH ratio was calculated as described by Williamson *et al.* (15).

Determination of the Free Nuclear NADH Concentration. Two-photon microscopy was performed to measure the nuclear autofluorescent NAD(P)H intensity as described (48). Cells were grown for 2 days on 35-mm glass dishes (MatTek, Ashland, MA) maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified chamber on the microscope stage (Carl Zeiss, Thornwood, NY). NAD(P)H intensity was imaged by using a \times 40, 1.3-NA oil immersion lens (Carl Zeiss), a 710-nm mode-locked Ti:Saph laser (\approx 3.5 mW at the sample) (Coherent, Santa Clara, CA), and fluorescence collection through a nondescanned detector with a custom 380- to 550-nm filter (Chroma, Rockingham, VT) (48). Images were analyzed with Metamorph 5.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

We thank H. Yao and J. Hildebrand for providing human primary fibroblasts and CtBP-null MEFs and C. Fjeld, M. King, R. Veech, R. Hanson, and G. Mandel for helpful comments. This work was supported by National Institutes of Health Grants P01DK044239 (to R.H.G.) and K01CA096561 (to Q.Z.).

- Blander G, Guarente L (2004) *Annu Rev Biochem* 73:417–435.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) *Science* 289:2126–2128.
- Lin SJ, Kaerberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L (2002) *Nature* 418:344–348.
- Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L (2004) *Genes Dev* 18:12–16.
- Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) *Nature* 403:795–800.
- Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6658–6663.
- Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O, Sinclair DA (2003) *Nature* 423:181–185.
- Rogina B, Helfand SL, Frankel S (2002) *Science* 298:1745.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA (2004) *Science* 305:390–392.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) *Nature* 434:113–118.
- Zhang Q, Piston DW, Goodman RH (2002) *Science* 295:1895–1897.
- Chinnadurai G (2002) *Mol Cell* 9:213–224.
- Kumar V, Carlson JE, Ohgi KA, Edwards TA, Rose DW, Escalante CR, Rosenfeld MG, Aggarwal AK (2002) *Mol Cell* 10:857–869.
- Nardini M, Spano S, Cericola C, Pesce A, Massaro A, Millo E, Luini A, Corda D, Bolognesi M (2003) *EMBO J* 22:3122–3130.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA (1967) *Biochem J* 103:514–527.
- Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14178–14182.
- Wielckens K, Schmidt A, George E, Bredehorst R, Hiltz H (1982) *J Biol Chem* 257:12872–12877.
- Zhang Q, Wang SY, Nottke AC, Rocheleau JV, Piston DW, Goodman RH (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9029–9033.
- Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB (1995) *Nat Med* 1:570–577.
- Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB (2005) *Cell* 123:437–448.
- Shigemori K, Ishizaki T, Matsukawa S, Sakai A, Nakai T, Miyabo S (1996) *Am J Physiol* 270:L803–L809.
- Merker MP, Bongard RD, Kettenhofen NJ, Okamoto Y, Dawson CA (2002) *Am J Physiol* 282:L36–L43.
- Deltour S, Pinte S, Guerardel C, Wasylk B, Leprince D (2002) *Mol Cell Biol* 22:4890–4901.
- Kang HT, Hwang ES (2006) *Life Sci* 78:1392–1399.
- Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E (1998) *Oncogene* 16:2159–2164.
- Hildebrand JD, Soriano P (2002) *Mol Cell Biol* 22:5296–5307.
- Zhang Q, Yoshimatsu Y, Hildebrand J, Frisch SM, Goodman RH (2003) *Cell* 115:177–186.
- Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (2004) *Cell* 119:815–829.
- Guarente L (2000) *Genes Dev* 14:1021–1026.
- Bedalov A, Hirao M, Posakony J, Nelson M, Simon JA (2003) *Mol Cell Biol* 23:7044–7054.
- Sugimoto E, Pizer LI (1968) *J Biol Chem* 243:2090–2098.
- Stinson RA, Holbrook JJ (1973) *Biochem J* 131:719–728.
- Kim SJ, Anderson BM (1969) *J Biol Chem* 244:1547–1551.
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (1993) *J Biol Chem* 268:22575–22580.
- Garriga-Canut M, Schoenike B, Qazi R, Bergendahl K, Daley TJ, Pfender RM, Morrison JF, Ockuly J, Stafstrom C, Sutula T, Roopra A (2006) *Nat Neurosci* 9:1382–1387.
- Zheng L, Roeder RG, Luo Y (2003) *Cell* 114:255–266.
- Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L (2005) *J Biol Chem* 280:21313–21320.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005) *Mol Biol Cell* 16:4623–4635.
- Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D (2006) *Genes Dev* 20:1256–1261.
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, *et al.* (2006) *Cell* 124:315–329.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin G, Grummt I, Guarente L (2006) *Genes Dev* 20:1075–1080.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, *et al.* (2006) *Cell* 126:941–954.
- Sinclair DA, Lin SJ, Guarente L (2006) *Science* 312:195–197; and author reply 195–197.
- Tissenbaum HA, Guarente L (2001) *Nature* 410:227–230.
- Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt MA, Imai S (2005) *Cell Metab* 2:105–117.
- Furuyama T, Banerjee R, Breen TR, Harte PJ (2004) *Curr Biol* 14:1812–1821.
- Alliston T, Ko TC, Cao Y, Liang YY, Feng XH, Chang C, Derynck R (2005) *J Biol Chem* 280:24227–24237.
- Rocheleau JV, Head WS, Piston DW (2004) *J Biol Chem* 279:31780–31787.

II. Publication n°5

HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors

Capucine FLEURIEL, Majid TOUKA, Gaylor BOULAY, Cateline GUERARDEL, Brian R. ROOD et
Dominique LEPRINCE.

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2009), 41, 26-33.

Cet article de revue fait le point sur le gène et la protéine HIC1.

Au cours d'une première partie les aspects fonctionnels sont détaillés, en lien avec les différentes régions de la protéine. Puis l'implication de ce gène au sein des cancers humains est décrite, ainsi que l'apport, sur son rôle dans la cancérisation, des études effectuées chez la souris après l'inactivation de ce gène, seul ou de manière concomitante à d'autres gènes suppresseurs de tumeurs – *p53* ou *Ptch1*. Enfin, HIC1 est proposé comme étant un gène « prémarqué » dans les cellules souches embryonnaires, par des marques épigénétiques bivalentes, menant à la notion de gène impliqué précocement lors de la cancérisation, au niveau des cellules souches du cancer.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

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

Medicine in focus

HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors

Capucine Fleuriel^a, Majid Touka^a, Gaylor Boulay^a, Celine Guérardel^a,
Brian R. Rood^b, Dominique Leprince^{a,*}

^a CNRS UMR 8161 «Institut de Biologie de LILLE», CNRS, Université de Lille 1 et de Lille 2, Institut PASTEUR de LILLE, 1 Rue Calmette, BP 447, 59017 Lille Cedex, France

^b Children's National Medical Center, Washington, DC, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 3 August 2008

Keywords:

HIC1
17p13.3
Transcriptional repression
p53
SIRT1

ABSTRACT

HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1), as its name implied, was originally isolated as a new candidate tumor suppressor gene located at 17p13.3 because it resides in a CpG island that is hypermethylated in many types of human cancers. *HIC1* encodes a transcription factor associating an N-terminal BTB/POZ domain to five C-terminal Krüppel-like C₂H₂ zinc finger motifs. In this review, we will begin by providing an overview of the current knowledge on *HIC1* function, mainly gained from *in vitro* studies, as a sequence-specific transcriptional repressor interacting with a still growing range of HDAC-dependent and HDAC-independent corepressor complexes. We will then summarize the studies that have demonstrated frequent hypermethylation changes or losses of heterozygosity of the *HIC1* locus in human cancers. Next, we will review animal models which have firmly established *HIC1* as a *bona fide* tumor suppressor gene epigenetically silenced and functionally cooperating notably with p53 within a complex *HIC1*-p53-SIRT1 regulatory loop. Finally, we will discuss how this epigenetic inactivation of *HIC1* might “addict” cancer cells to altered survival and signaling pathways or to lineage-specific transcription factors during the early stages of tumorigenesis.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

For a long time cancer has been considered as a group of diseases driven by genetic modifications including chromosomal translocations, gene amplifications or point mutations in oncogenes or in tumor suppressor genes. However, it is now becoming increasingly clear that epigenetic changes, marked by DNA methylation and histone tail modifications, which convey heritable gene expression patterns, are also central to many human diseases including cancer.

DNA hypermethylation changes at the D17S5 locus in many cancers allowed the positional cloning of *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1) as a candidate tumor suppressor located in 17p13.3, a region frequently hypermethylated or deleted in many types of prevalent human tumors (Wales et al., 1995). *HIC1* encodes a transcription factor with five Krüppel-like C₂H₂ zinc finger motifs (Wales et al., 1995; Deltour et al., 1999, 2002; Pinte et al., 2004b).

In this review, we will first provide an overview of the current understanding of *HIC1* function as a sequence-specific transcriptional repressor. We will then describe the studies and animal models which unambiguously defined *HIC1* as a tumor suppressor gene epigenetically silenced in many prevalent human cancers.

2. *HIC1*: genomic organization

From sequencing analyses of genomic clones and from functional assays, the exon–intron structures of the human and murine *HIC1* genes appeared very similar with alternative first exons followed by a unique second exon, containing a coding region and a 3′ untranslated region (Carter et al., 2000; Guérardel et al., 2001). The human *HIC1* genomic region contains three promoters that give rise to different alternatively spliced transcripts. Exon **1a** is non-coding and associated with the major G–C rich promoter, P1 whereas exon **1b** is coding and associated with a minor TATA promoter called P0 (Fig. 1) (Carter et al., 2000; Guérardel et al., 2001). Exon **1c**, as well as internally spliced exons called **1d** and **1e** are transcribed from a third upstream GC rich promoter, P2 conserved in the murine and rat genomes (Pinte et al., 2004a). However, transcripts initiated from this P2 promoter can only be detected by sensitive RT-PCR analyses. By contrast, **1a** and **1b** transcripts are detected by Northern blot in various normal tissues with a predominance for exon **1a** transcripts and are upregulated by p53 and other p53 family members, notably TAp73β and ΔNp63α (Wales et al., 1995; Guérardel et al., 2001; Britschgi et al., 2006). The p53 responsive element in *HIC1* is highly conserved in position (in the intron between exons **1a** and **1b**) and in sequence among various species (Britschgi et al., 2006).

In addition, a novel, unspliced transcript variant, called **f**, has been recently identified in normal leukocytes and in two human glioma cell lines, U87MG (wild-type p53) and U373MG (mutant

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 87 1119; fax: +33 3 20 87 1111.
E-mail address: dominique.leprince@ibl.fr (D. Leprince).

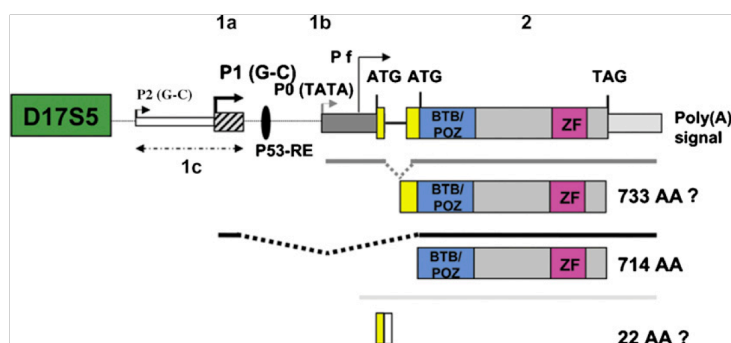


Fig. 1. Genomic organization of the human *HIC1* locus. The structure of the human *HIC1* locus as derived from several studies is schematically drawn (Wales et al., 1995; Guerardel et al., 2001). A similar organization is found in mice (Guerardel et al., 2001; Carter et al., 2000). The two major promoters, called P1 and P0 and the minor P2 promoter generating *HIC1* transcripts with heterogeneous 5' ends are represented (Guerardel et al., 2001; Pinte et al., 2004a). For clarity, only the major types **1a** and **1b**, but not the minor **1c**, **1d** and **1e** transcripts have been shown below the human *HIC1* genomic locus (Pinte et al., 2004a). In addition, the type **1a** transcripts are by far the most abundant *HIC1* transcripts. In human, only the **1b** exon contains an ATG codon in-frame with the ATG initiation codon located in exon 2. It should be noted however that the existence of this 733 amino acid protein deduced from computer analyses has never been firmly established, through immunodetection with specific antibodies. Recently, RT-PCR analyses have identified an unspliced transcript, called **1f** initiated at an alternative promoter within exon **1b**. This transcript could potentially encode a short 22 amino-acid polypeptide initiated at the ATG codon of exon **1b** and terminated by a stop codon in the intron (Mondal et al., 2006). The p53 binding site involved in the direct regulation of *HIC1* transcription (Wales et al., 1995; Guerardel et al., 2001; Britschgi et al., 2006) is shown as a dark oval.

p53) (Mondal et al., 2006). This unspliced transcript initiates from an alternate transcription start site localized 164bp downstream of the **1b**-specific promoter and could possibly encode a 22-amino acid polypeptide. In addition, this **f** transcript is not under the direct control of p53 but is induced in p53 wild-type cells grown in adverse conditions with a kinetic in opposite phase with the spliced transcripts. However, the biological significance of this **f** transcript has still to be elucidated although it has been suggested to regulate the level of *HIC1* protein in cancer cells (Mondal et al., 2006).

3. *HIC1*: functional aspects

The *HIC1* protein is a sequence-specific transcriptional repressor containing three main functional domains (Fig. 2): (i) the N-terminal BTB/POZ (which stands for *Broad complex*, *Tramtrack* and *Bric à brac*/Poxviruses and Zinc finger) domain of about 120 amino-acid is a dimerization domain known to play direct or indirect (through conformational effects) roles in protein–protein interactions. This domain is also an autonomous transcriptional repression domain (Albagli et al., 1995; Stogios et al., 2005; Kelly and Daniel, 2006); (ii) the C-terminal end contains five *Krüppel*-like C_2H_2 zinc fingers which bind a recently defined DNA sequence, termed the HiRE (*HIC1* responsive element) (Pinte et al., 2004b) and a tail that displays no obvious functional domain but has been phylogenetically conserved (Deltour et al., 1998); (iii) a central region which is a second autonomous transcriptional repression domain (Deltour et al., 2002; Stankovic-Valentin et al., 2006; Stankovic-Valentin et al., 2007).

Due to alternative splicing mechanisms, *HIC1* could encode two highly related proteins. The major **1a**-type transcripts direct the synthesis of a 714 amino acids protein encoded by the ORF in exon 2. Transcripts containing the conserved coding exon **1b** could encode an alternative putative protein containing 19 additional N-terminal amino acids (12 derived from exon **1b** and 7 derived from 5' sequences in exon **2** that are converted into coding sequences) (Fig. 1) (Guerardel et al., 2001).

3.1. The BTB/POZ domain

The BTB/POZ domain is a highly conserved and widely distributed structural motif found mainly in transcription factors

(Albagli et al., 1995). Crystal structures of several human BTB/POZ domains have demonstrated that this domain is a butterfly-shaped tightly intertwined obligate dimer with a conserved dimerization interface (Ahmad et al., 1998). BTB/POZ domains are protein–protein interaction domains and mediate homooligomerization, hetero-oligomerization as well as interactions with non-BTB/POZ proteins (Stogios et al., 2005). These properties are essential for the biological function of BTB/POZ-containing proteins. For example, the BCL6 BTB/POZ domain directly recruits nuclear corepressors SMRT, N-CoR or B-CoR/Histone deacetylase (HDACs) complexes in an exclusive manner. Co-crystal structure between the BCL6 BTB/POZ domain and a 17 amino-acid SMRT peptide have highlighted a lateral groove (Ahmad et al., 2003) that is bound competitively by B-CoR (Ghetu et al., 2008). Furthermore, the critical residues engaged in the interaction are not very well conserved, suggesting that distinct binding sites may exist and that protein–protein recognition modes could be specific to each BTB/POZ domain. The *HIC1* BTB/POZ domain is also an autonomous transcriptional repression domains but is insensitive to trichostatin A (TSA), a specific inhibitor of class I and class II HDACs (Deltour et al., 1999; Deltour et al., 2001). It has been recently shown that *HIC1* forms a transcriptional repression complex with the class III HDAC, SIRT1 and that this complex directly binds the *SIRT1* promoter to repress its transcription (Chen et al., 2005). SIRT1 is a NAD-dependent deacetylase which is insensitive to TSA but sensitive to nicotinamide (NIA) (Saunders and Verdin, 2007). The *HIC1* BTB/POZ domain interacts with SIRT1 (Chen et al., 2005) but its repressive activity in the context of a Gal4 chimera is not inhibited by NIA (our unpublished results).

Thus, the repression mechanisms inherent to the *HIC1* BTB/POZ domain have still to be deciphered.

3.2. The *HIC1* central region

The *HIC1* central region has not been subjected to a strong selection pressure except for four peptidic motifs perfectly conserved from human to zebrafish (Bertrand et al., 2004). One of them, GLDLSKK, is highly related to the canonical motif PxDL-SxK/R found in proteins interacting with the co-repressor CtBP (C-terminal binding protein) (Chinnadurai, 2007). We have demonstrated that *HIC1* interacts with the two related CtBP1 and CtBP2

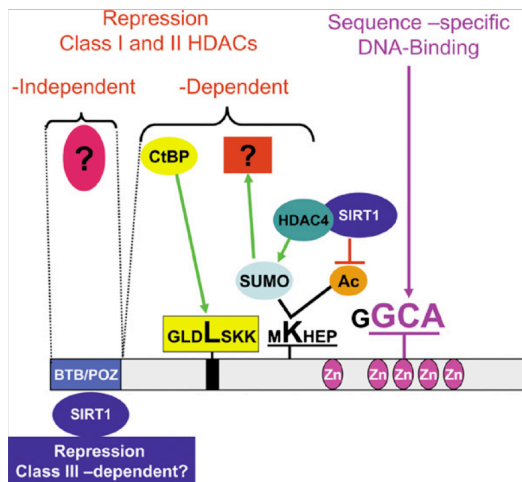


Fig. 2. Domain organization of the human HIC1 protein. The two autonomous repression domains of HIC1, the BTB/POZ domain and the central region, are shown together with the known molecular mechanisms underlying their repression potential. Although HIC1 interacts with the class III deacetylase SIRT1 (Chen et al., 2005), its direct role in the BTB/POZ-mediated repression is not fully established. The corepressor complex(es) involved in the TSA-insensitive repression potential of the BTB/POZ domain (Deltour et al., 1999) have still to be identified. The Central Region contains four short peptides motifs which have been phylogenetically conserved. The function of two of them has been deciphered. The GLDLSKK motif is a variant of the classical CtBP interacting domain (CID), the PLDLS motif, involved in the recruitment of the CtBP corepressor (Deltour et al., 2002; Chinnadurai, 2007). The only invariant residue among CtBP interacting domains, Leucine 225 is highlighted since its mutation impairs the interaction between HIC1 and CtBP (Stankovic-Valentin et al., 2006). The lysine K314 is contained within a MKHEP motif which is a SUMOylation/acetylation switch motif (Stankovic-Valentin et al., 2007). The transcriptional repression potential of HIC1 is positively controlled by a complex between two types of deacetylases, SIRT1 and HDAC4. SIRT1 deacetylates HIC1 at lysine K314 whereas HDAC4 favors its SUMOylation through a mechanism still poorly understood (Stankovic-Valentin et al., 2007). The corepressor(s) whose recruitment is positively regulated by HIC1 SUMOylation as well as the CtBP-independent corepressors recruited by the central region are currently unknown (Stankovic-Valentin et al., 2006; Stankovic-Valentin et al., 2007). HIC1 binds specifically to DNA through its 5 C-terminal zinc fingers (ZF) domain that recognizes the consensus sequence 5'-C₁NG₁C₁GGGCA₁ACC-3' centered on a GGCA core motif bound by Zinc fingers 3 and 4 (Pinte et al., 2004b). The HIC1 BTB/POZ domain negatively regulates the DNA-binding of the full-length protein to a single site whereas the oligomerization of the protein via this domain mediates cooperative DNA-binding to multiple sites (Pinte et al., 2004b).

corepressors through this conserved GLDLSKK motif thus extending the CtBP binding site (Deltour et al., 2002; Stankovic-Valentin et al., 2006). Notably, mutation of the central leucine residue, Leu 225 in HIC1, which is the only invariant residue in CtBP-interaction motifs, abolished the interaction between HIC1 and CtBP (Fig. 2) (Stankovic-Valentin et al., 2006). As would be expected from the corepressor activity of CtBP, the L225A point mutation or deletion of the GLDLSKK motif impairs the repression potential of the HIC1 central region, but does not fully abolish it (Stankovic-Valentin et al., 2006). Thus, the HIC1 central region appears to be a second repression domain exhibiting both CtBP-dependent and CtBP-independent repression mechanisms, both of which are sensitive to TSA.

The second conserved motif is an YRWM/VK³¹⁴xEP motif (Stankovic-Valentin et al., 2007) which contains a potential SUMOylation consensus site, ψ KxE. SUMOylation is a reversible post-translational modification in which a member of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family of proteins is covalently conjugated to lysine residues in target proteins (Verger et al., 2003; Hay, 2005; Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Unlike ubiqui-

itination which generally marks proteins for rapid degradation, SUMOylation of nuclear proteins has very diverse effects on transcriptional activity ranging from regulation of DNA-binding activity, subcellular localization and assembly of multiprotein complexes. In the case of HIC1, SUMOylation of K314 does not affect its subnuclear localization and its interaction with CtBP, HDAC4 and SIRT1 but does positively regulate the transcriptional repression potential (Stankovic-Valentin et al., 2007).

Lysine residues can be targeted by several post-translational modifications including SUMOylation, acetylation, ubiquitination or methylation. The ψ KxE motif in HIC1 with the Proline residue conserved from human to zebrafish is related to the G/SKxxP consensus motif for acetylation by CBP/P300. Indeed, we have shown that HIC1 is acetylated on various lysine residues including K314. Thus, the ψ KxE motif is an acetylation/SUMOylation switch which is related to the ψ KxE₁xxSP, phosphorylation-regulated SUMOylation-acetylation switch motif (SAS) found in the major MEF2 isoforms (Shalizi et al., 2006). In both cases, the cross-talk between these two competitive post-translational modifications of lysine residues is orchestrated by a new complex associating two distinct types of deacetylases, HDAC4 and SIRT1. Even though the precise mechanisms are not fully understood, these results identify HIC1 as a new target of the class III deacetylase SIRT1.

In conclusion, the HIC1 central region is essential for the transcriptional repression potential of HIC1. But, corepressors and complexes interacting with this region have still to be characterized.

3.3. The zinc finger DNA-binding domain and the HIC1 target genes

The C-terminal end contains a cluster of four conserved C₂H₂ zinc fingers (ZF2–5) which are separated by the typical 7–8 amino acid conserved H/C links found in Krüppel-like zinc fingers, making them likely to be involved in sequence-specific DNA-binding. Using a combination of functional assays and *in silico* analyses, we have identified the sequence 5'-C₁NG₁C₁GGGCA₁ACC-3' as an optimal HIC1 binding site (HiRE for HIC1-responsive element) and validated by mutational analyses a GGCA core motif bound by zinc fingers 3 and 4 (Fig. 2) (Pinte et al., 2004b). In addition, HIC1 proteins contain a more distant and isolated upstream zinc finger motif (ZF1) which is conserved but is unlikely to contribute to DNA-binding.

We have also shown that the full-length HIC1 protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) (Lefebvre et al., 2004). This glycosylation is a dynamic modification of nuclear or cytoplasmic proteins by a single residue of N-acetylglucosamine on serine and threonine residues and can compete with phosphorylation (Guinez et al., 2005). Using deletion mutants, we have shown that most of the O-GlcNAc modifications of HIC1 occur in the DNA-binding domain although it does not affect its specific DNA-binding activity.

The full-length HIC1 protein is unable to bind to a single optimized site and this DNA-binding inhibition is clearly BTB/POZ-dependent. Whereas the HIC1 BTB/POZ domain impedes binding to a single site, it mediates strong cooperative binding to a probe containing multiple optimized sites (Pinte et al., 2004b).

The first *bona fide* HIC1 direct target gene, *SIRT1*, contains a cluster of two HiRE in the same orientation located at the 5' end of the promoter (Chen et al., 2005). ChIP and ChIP upon ChIP assays demonstrated that HIC1 forms a transcriptional repression complex with the deacetylase SIRT1 to directly bind the *SIRT1* promoter and repress its transcription. *SIRT1* can also be regulated by HIC1 in response to acute metabolism changes by a complex between HIC1 and the redox sensor CtBP corepressor (Zhang et al., 2007).

The second HIC1 target gene, *FGF-BP1* (Fibroblast Growth Factor-Binding Protein 1) has been shown to play key roles in blood vessel development in the growing embryo as well as in tumor angiogenesis. This extracellular matrix bound protein enhances fibroblast growth factor (FGF) signaling which induces endothelial cell proliferation and smooth cell differentiation. TGF- β represses *FGF-BP1* mRNA expression through its intermediates, the transcription factors Smad2 and Smad3. However, functional analyses of the *FGF-BP1* promoter using deletion constructs identify a region containing a HIC1 binding site, which could participate to the repression of *FGF-BP1* by TGF- β (Briones et al., 2006). This potential link between HIC1 and two pathways involved in angiogenesis is particularly interesting given HIC1's strong association with many human tumors.

Very recently, *Atonal Homolog1* (*Atoh1/Math1*), a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor expressed in and required for the proper development of various neural progenitor cells, notably including cerebellar granule cells has been identified as a direct transcriptional target of HIC1 through genome-wide profiling analysis of HIC1-deficient medulloblastoma D425 cells infected with adenoviruses expressing HIC1 (Briggs et al., 2008). The proper expression of *Atoh1* in the developing central nervous system relies on a 1.4 kbp downstream enhancer region that contains two adjacent ChRE in the same orientation, as observed in the *SIRT1* promoter (Chen et al., 2005). These two sites are bound by HIC1 as shown by chromatin immunoprecipitation experiments in normal mouse embryonic cerebella (Briggs et al., 2008).

Besides its direct target genes which remain largely to be identified, HIC1 could also bind to other transcription factors and "indirectly" repress transcription of target genes that do not contain HIC1 binding sites. HIC1 was shown to interact with TCF4, a major component of the Wnt signaling pathway, in a complex multidomain mode of interaction. As a consequence, TCF4 and β catenin are recruited to discrete nuclear structures called HIC1 bodies and diverted from the Wnt-responsive promoters (Valenta et al., 2006). Thus, the intracellular amounts of HIC1 protein can modulate the transcriptional stimulation of genes regulated by canonical Wnt/ β catenin signaling.

Further work will be required to determine if these HIC1 bodies can also sequester other transcription factors away from their DNA targets.

4. Inactivation of HIC1 is frequent in cancers

From the beginning, the history of *HIC1* has been directly linked to *P53*. Indeed, loss of heterozygosity (LOH) on the short arm of chromosome 17 (17p) is one of the most common genetic alterations in human cancers and allelic losses most often coincide with mutations in the *TP53* gene at 17p13.1 (Ko and Prives, 1996). However, it became rapidly obvious that in breast and ovarian tumors, 17p allelic losses occur at high frequency in regions distal to *TP53* and even in the absence of *TP53* mutations. Consequently, these studies led to the proposal that one or more tumor suppressor genes whose loss of function is required for early tumorigenesis may reside in a region telomeric to *TP53* (Cornelis et al., 1994; Sakamoto et al., 1996; Liscia et al., 1999). A good candidate region was 17p13.3 containing the VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) microsatellite marker YNZ22/D1755/D17530 that exhibits frequent DNA hypermethylation in lung and colon cancer (Makos et al., 1992) as well as in neural (Makos et al., 1993a; Rood et al., 2002) and renal tumors (Makos et al., 1993b). Indeed, DNA hypermethylation changes of the NotI restriction sites at the D1755 locus in many cancers allowed the positional cloning and characterization by nucleotide sequencing of a new gene called *HIC1* (Hypermethylated in Cancer 1) (Wales et al., 1995).

HIC1's role as a candidate tumor suppressor gene is supported by several observations: it is epigenetically silenced by promoter hypermethylation in many tumor cell lines as well as in primary colon and brain tumors; its enforced expression by stable transfection in various cancer cell lines results in a significant decrease in their clonogenic survival and its expression can be upregulated by p53 (Wales et al., 1995).

4.1. HIC1 inactivation in solid tumors

After this pioneering work, several groups have confirmed these observations using the methylation-sensitive restriction enzyme NotI and Southern blotting with D1755 or *HIC1* probe as well as more sensitive and informative assays such as methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing. These studies have extended the epigenetic silencing of *HIC1* to prostate cancers (Morton et al., 1996); non-small cell lung cancers (Eguchi et al., 1997; Hayashi et al., 2001); breast cancers (Fujii et al., 1998); gastric and liver cancers (Kanai et al., 1998; Kanai et al., 1999); esophageal cancers (Huang et al., 2000; Eads et al., 2001) and human male non-seminomatous germ cell tumors (Koul et al., 2002). Epigenetic silencing of *HIC1* has been also very frequently observed in the most common malignant brain tumor of childhood medulloblastoma (Rood et al., 2002; Rathi et al., 2003; Waha et al., 2003) and the glial malignancy, ependymoma (Waha et al., 2004).

HIC1 is thus epigenetically silenced in many types of common human cancers. However, some general conclusions can be drawn. First, loss of heterozygosity (LOH) is often associated and in fact preceded by DNA hypermethylation (Makos et al., 1993b; Ahuja et al., 1997; Kanai et al., 1999). For example, *HIC1* is virtually completely methylated in 27 out of 39 breast cancer tissues tested (67%) and LOH of the telomeric part of 17p where *HIC1* is located, is observed in 22 out of these 27 cases with *HIC1* hypermethylation (Fujii et al., 1998). Second, the level of *HIC1* promoter hypermethylation is variable and a high density of methylation is associated with aggressiveness of the tumor and poor overall survival (Wales et al., 1995; Nicoll et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Rood et al., 2002; Waha et al., 2004). Finally, dense hypermethylation of one *HIC1* allele has also been detected in some normal tissues including kidney (Makos et al., 1993a), histologically normal prostate and benign hyperplastic (BPH) tissues (Morton et al., 1996), normal ductal breast tissues (Fujii et al., 1998) and in normal brain and cerebellum (Rood et al., 2002). This is in striking contrast with the lack of *HIC1* hypermethylation in most normal tissues (Wales et al., 1995) and suggests that these tissues might be at higher risk for developing cancer since one copy of *HIC1* is already constitutively inactivated.

There is some evidence from human tumor specimens to suggest that epigenetic *HIC1* silencing events predispose tissues to tumorigenesis. In paired tumorous and non-tumorous tissues from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), *HIC1* was found to be methylated in 33% and 31%, respectively. Further, methylation occurred with a significantly greater incidence in tumorous and non-tumorous tissues from smokers compared to non-smokers (Eguchi et al., 1997). DNA methylation was inversely correlated with tumor cell differentiation and positively correlated with LOH at the same locus. These results support *HIC1* methylation as a smoking-related pre-cancerous event involved in the tumorigenesis of less differentiated NSCLC. In addition, methylation in the region of the tumor suppressor gene *HIC1* increases across the histologic spectrum extending from normal liver tissues to the pre-cancerous conditions of chronic hepatitis and cirrhosis to hepatocellular carcinoma (Kanai et al., 1999). In colon cancer, DNA on chromosome arm 17p13.3 exhibits increasing methylation density from normal colonic mucosa to pre-cancerous colonic polyps to colon cancer (Makos et al., 1992).

4.2. *HIC1* inactivation in hematological malignancies

Besides its implication in solid tumors, *HIC1* is also a tumor suppressor gene epigenetically silenced in some leukemia. Indeed, *HIC1* is not methylated in normal peripheral blood cells, in bone marrow cells or in purified CD34+ progenitor cells and only rarely methylated in acute leukemias at diagnosis (10%) and in the chronic-phase of chronic myelogenous leukemia CML (50%) (Issa et al., 1997a,b). By contrast, *HIC1* is found methylated in virtually all recurrent acute lymphocytic leukemia and in the blast-crisis of all CML. *HIC1* hypermethylation has thus been considered to be a late event in hematopoietic neoplasms (Issa et al., 1997a,b). Two others studies have detected a high level of methylation in acute myeloid leukemia by bisulfite sequencing, but in the central coding region of *HIC1* (Melki et al., 1999a,b). A recent study has demonstrated that *HIC1* expression is low in 128 patient samples of AML and in CD34+ progenitor cells as compared to terminally differentiated granulocytes (Britschgi et al., 2008). However, the *HIC1* promoters are not methylated as shown by bisulfite sequencing or treatment with the demethylating agent 5-Aza-dC which induces *HIC1* expression but less efficiently than the differentiation agent all-*trans* retinoic acid (ATRA) (Britschgi et al., 2008). Thus, these results suggest that *HIC1* might play a role in granulocytic differentiation and that low expression of *HIC1*, which is not due to promoter hypermethylation, could contribute to leukemogenesis.

Finally, *HIC1* has also been recently implicated as a tumor suppressor gene in a subset of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs). Classically, hypermethylation of *HIC1* promoter is accompanied by simultaneous deletion of the second allele in ca 90% of the cases (Stocklein et al., 2007).

5. Mouse models of *Hic1* and cancer

The epigenetic silencing or deletion of *HIC1* in numerous primary tumors and cell lines strongly suggested that it could be a new tumor suppressor gene. Unquestionable clues to the tumor suppressor function of *HIC1* have come from the study of *Hic1*-deficient mice developed in Dr Baylin's laboratory (Chen et al., 2003). Building on this work, two double heterozygote models have shown that *Hic1* can cooperate with *p53* and *Ptch1* in tumorigenesis (Chen et al., 2004; Briggs et al., 2008).

5.1. *Hic1*+/- heterozygotes

Whereas homozygous disruption of *Hic1* impairs development and results in embryonic and perinatal lethality (Carter et al., 2000), heterozygous *Hic1*+/- mice develop an age- and gender-dependent spectrum of malignant tumors with a predominance of epithelial cancers in males (75%) and lymphomas and sarcomas (80%) in females (Chen et al., 2003). Overall, 44% of the malignant tumors were epithelial cancers in *Hic1*+/- mice. Such a high percentage is unusual when compared with the preponderance of lymphomas and sarcomas observed in other knockout models of tumor suppressor genes or in aged mice but is reminiscent of the cancer types seen in adult humans (DePinho, 2000). So far, these gender effects seen in mice have not been reported in human cancer: a female predominance has not been observed among *HIC1* heterozygous diffuse large B-cell lymphoma patients (Stocklein et al., 2007). Another attribute is illustrated by the *Dmp1* heterozygous knockout model. *Dmp1* is haplo-insufficient for tumor suppression and the wild-type *Dmp1* allele is retained and expressed in spontaneous tumors arising in *Dmp1*+/- heterozygous mice (Inoue et al., 2001). By contrast, no *Hic1* expression has been detected in the *Hic1*+/- tumors (Chen et al., 2003). In fact, loss of function of the remaining

Hic1 allele in heterozygous mice is not due to gross chromosomal deletions but rather occurs only in association with hypermethylation of one of the two major alternative promoters of the gene as in human cancers. Bisulfite genomic sequencing of human tumor cell lines not expressing *HIC1* have detected in most cases a dense methylation only of the **1b** promoter although the most abundant *HIC1* transcripts in the corresponding normal tissues are derived from the **1a** promoter. In the *Hic1*+/- heterozygous mice, a dense methylation of the **1a** but not the **1b** promoter on the remaining allele is observed in the lymphomas and sarcomas arising mainly in females. Conversely, a dense methylation of the **1b** promoter is found in the carcinomas and adenomas arising mainly in males (Chen et al., 2003). The transcription factor networks and the mechanisms underlying this complex tissue-, age- and sex-dependant epigenetic regulation of *HIC1* are yet to be identified.

These results clearly demonstrate that loss of function of *Hic1* can lead to cancers. *HIC1* was originally identified by virtue of its frequent epigenetic inactivation in tumors and so far point mutations inactivating *HIC1* have not been reported. For example, a search for SSCP in the *HIC1* coding sequence in 68 medulloblastomas only detected a single case of an in-frame deletion of four GGC codons in a Glycine-rich sequences located after the BTB/POZ domain with no effect on the downstream reading frame (Waha et al., 2003).

Thus, the case of *HIC1* further illustrates that characterization of the "methylome", the complete set of DNA methylation modifications of a cell, is a potent tool for discovery of new tumor suppressor genes (Jones and Baylin, 2007).

5.2. *Tp53*+/- and *Hic1*+/- cis or trans double heterozygotes

Hic1 and *p53* are located on the same chromosome in humans (chromosome 17) and mice (chromosome 11). Two models of double heterozygous knockout mice with disruption of both genes either on the same chromosome (*cis*) or on separate chromosomes (*trans*) have been generated (Chen et al., 2004). The *cis* double heterozygotes have an accelerated tumorigenesis as compared to *p53*+/- mice and predominantly develop aggressive metastatic osteosarcomas, breast and ovarian tumors instead of soft tissues sarcomas. In these *cis* tumors, the remaining *p53* and *Hic1* wild-type alleles are simultaneously deleted due to loss of the entire chromosome. By contrast, the *trans* *Hic1*+/- *p53*+/- mice have no acceleration of tumorigenesis as compared to *p53*+/- mice, albeit their tumors also develop in an age-dependant manner with a higher incidence of osteosarcomas. In the *trans* tumors, the remaining *Hic1* allele is retained and epigenetically silenced by hypermethylation while the *p53* allele undergoes interstitial deletion. The combination of these two events as compared to simultaneous deletion of the two genes could easily explain the earlier appearance and more severe phenotype observed in the *cis* animals (Chen et al., 2004). Thus, the epigenetically silenced gene *Hic1* cooperates with the mutated tumor suppressor gene *p53* in determining cancer prevalence, progression and spectrum.

5.3. *Ptch1*+/- and *Hic1*+/- double heterozygotes

Medulloblastoma, a childhood brain tumor arising from cerebellar granule cell precursors (GCPs) frequently displays inappropriate constitutive activation of the Hedgehog (Hh) signaling pathway as well as chromosome 17p deletion (Ferretti et al., 2005). The *PATCHED* (*PTCH*) transmembrane receptor, an inhibitor of the *SMOOTHENED* (*SMO*) co-receptor for Hedgehog (Hh) is a tumor suppressor gene inactivated in sporadic medulloblastoma and *Ptch1*+/- heterozygotes spontaneously develop medulloblastomas at a frequency of 10–15% (Goodrich et al., 1997). In addition, germline mutations in *PATCHED* result in the nevoid basal cell carci-

noma syndrome (Gorlin syndrome) which is often associated with medulloblastoma. Whereas mutations in elements of the Hedgehog signaling pathway are found in less than 25% of sporadic medulloblastomas, deletion of chromosome 17p occurs in up to 50% of the cases and is frequently restricted to the 17p13.1–13.3 region containing several tumor suppressor genes including *p53*, *REN*, *MNT* and *HIC1* (Ferretti et al., 2005). *P53* is not frequently mutated in medulloblastomas (less than 10%) but loss of function of *p53* significantly increases the frequency of medulloblastomas occurring in *Ptch1*^{+/-} *p53*^{+/-} animals as compared to *Ptch1*^{+/-} heterozygotes (Wetmore et al., 2001). Similarly, a recent study revealed a four-fold increase in medulloblastomas incidence in *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} (19/45) as compared to their *Ptch1*^{+/-} littermates (Briggs et al., 2008). Apart from this increased incidence, the time frame and the type of tumors did not vary between these two cohorts, in striking contrast with the *p53*^{+/-} *Hic1*^{+/-} heterozygotes in which distinct tumors appear earlier than in the *p53*^{+/-} cohort (Chen et al., 2004).

Whereas *Hic1* is expressed during the differentiation of granule cell precursors, its expression (measured at mRNA and proteins levels) is markedly reduced in *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} and *Ptch1*^{+/-} medulloblastomas (Briggs et al., 2008). In both cases, this is due to the methylation of the **1b** promoter, as demonstrated by bisulfite sequencing. At the molecular level, *Hic1* does not play a key role in Hedgehog pathway regulation. Thus, its loss of function is not likely to directly participate in the activation of this pathway but could rather result in the overexpression of target genes ultimately leading to tumorigenesis. ATOH1, a transcription factor expressed in precursor granule cells and in medulloblastoma, activated by the Hh pathway and identified as a direct target of the HIC1-mediated transcriptional repression, nicely fulfills these criteria (Briggs et al., 2008). Moreover, siRNA-mediated knockdown of ATOH1 dramatically reduces the viability of a cell line derived from a *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} medulloblastoma. According to these data, Briggs et al. proposed the following model (Briggs et al., 2008). In *Ptch1*^{+/-} heterozygotes, puffs of GCP-like progenitors persist in the external granule cell layer, forming a presumed precursor lesion. Since *Hic1* is hypermethylated in the *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} and *Ptch1*^{+/-} medulloblastomas, its epigenetic inactivation favored in the context of the *Ptch1*^{+/-} *Hic1*^{+/-} double heterozygotes could be one of the next deficiencies accumulated in the *Ptch1*^{+/-} precursor lesion contributing to tumorigenesis (Briggs et al., 2008). The cooperation between these two tumor suppressors, the HIC1 transcriptional repressor and the Hh-receptor PATCHED1, is highly relevant to human medulloblastoma, in which deletion of the chromosomal 17p region would thus result in the loss of Hedgehog modulators such as *REN* (Di Marcotullio et al., 2004) and in the loss of regulators of lineage-specific transcription factors, as exemplified above by the HIC1-ATOH1 connection.

6. HIC1: a cancer stem cell gene pre-marked for aberrant silencing in ES cells

According to the cancer stem cell hypothesis which is now widely accepted, tumors contain and are driven by a minority cellular population which has retained key stem-cell properties including self-renewal, pluripotency and the ability to reinitiate the tumor mass containing the cellular heterogeneity observed in the original tumor (Jones and Baylin, 2007). Numerous studies have highlighted the key roles of epigenetic signatures in stem-cell identity (reviewed in (Spivakov and Fisher, 2007)). In pluripotent embryonic stem cells (ES), whereas pluripotency-associated transcription factors such as Nanog or Oct4 are expressed, the promoters of some developmental transcription factors are in a “bivalent state” with both activating (H3K9Ac and H3K4me) and repressive (H3K27me) epigenetic marks. Thus, these promoters are

“poised” in a transcription-ready state which, depending on the developmental cues, can be tipped toward activation of tissue-specific genes or reversible silencing of genes involved in other developmental pathways. Indeed, in differentiated cells, the promoters of many non-transcribed genes have lost the activating marks and are enriched with the H3K27 trimethylated mark which is deposited by the Polycomb repressor complex 2 (PRC2) (Spivakov and Fisher, 2007).

Besides these genome-wide analyses, three studies in ES cells have determined the epigenetic status of restricted lists of genes defined as tumor suppressor genes frequently hypermethylated in cancer. Two of these studies have demonstrated that a very high percentage of genes specifically methylated in colon, breast and ovarian cancers are pre-marked with trimethylated H3K27 and other PRC2 components in ES cells (Lee et al., 2006; Schlesinger et al., 2007; Widschwendter et al., 2007). The third study analyzed the malignant counterpart of ES cells, the embryonal teratocarcinoma (EC) (Ohm et al., 2007). EC are neoplastic embryonic cells, but in contrast with adult cancer cells they can retain properties of spontaneous differentiation and of lineage commitment *in vivo* and *in vitro*, albeit to a lesser extent than their normal ES counterparts. This study has further shown that embryonal carcinoma (EC) cells retain the bivalent marks typical of ES cells but display two additional repressive marks clearly linked to DNA methylation, H3K9me2 and H3K9me3 (Ohm et al., 2007). Collectively, these three studies strongly support the stem-cell origin of cancer and help to understand how normal stem cells with a transient transcription-ready state are converted into cancer progenitor cells with the permanent and heritable epigenetic silencing via DNA hypermethylation of some key genes probably due to aberrant crosstalk between the EZH2 component of PRC2 and DNA-methyltransferases (DNMTs). In fact, the loss of function of these genes could draw these progenitor cells from the normal differentiation pathway and lock them into a state of perpetual self-renewal poised for tumorigenesis with the accumulation of further epigenetic or genetic events. Indeed, these cells could become dependent upon the pathways that are deregulated through the stable silencing of these genes. This dependency is termed “epigenetic sensitization” or “epigenetic cellular addiction” (Baylin and Ohm, 2006) and can favor the selection of cells that have additional cooperating mutations.

From these studies, HIC1 has been defined as a “stem cell gene” (a gene marked with at least two out of the three components SUZ12, EED and H3K27me3 in human ES cells) in colorectal cancer, ovarian cancer and CD34 positive hematopoietic progenitor cells (Widschwendter et al., 2007) but not in breast cancer. This exception may be due to its hemi-methylation in normal breast epithelium (Fujii et al., 1998). In addition, HIC1 is unmethylated in human ES cells and partially or fully methylated in two embryonal carcinomas cell lines, Tera-1 and Tera-2, respectively (Ohm et al., 2007).

Thus, in early tumorigenesis, epigenetic inactivation of HIC1 could induce an increase in SIRT1 deacetylase activity. The resulting deacetylation of P53 impairs its function leading to a defective apoptotic response to DNA-damage and a reduced ability to transactivate its target genes including HIC1 (Chen et al., 2005). This HIC1-SIRT1-P53 regulatory loop is an essential pathway through which HIC1 may function as a tumor suppressor gene and cooperate with P53, as shown by the double heterozygote model. SIRT1 can deacetylate not only P53 but also many other target proteins essential for normal homeostasis. Thus, epigenetic silencing of HIC1 can have both P53-dependent and P53-independent effects.

Moreover, HIC1 can also interfere with several other essential signaling pathways. For example, in normal conditions, HIC1 sequesters TCF4, a key transcriptional factor to which converges

Wnt signaling, into nuclear substructures called “HIC1 nuclear bodies” and thus divert TCF4 from its transcriptional targets (Valenta et al., 2006). Loss of *HIC1* expression in early tumorigenesis results in an increase of TCF4-mediated target gene expression and thus “addicts” the cells to an activated Wnt/ β catenin signaling pathway.

A similar situation occurs through the direct transcriptional regulation of *ATOH1*, a transcriptional relay of the Hedgehog signaling pathway as detailed above (Briggs et al., 2008).

7. Conclusions and future directions for research

Thirteen years after its discovery by Dr Baylin's laboratory, *HIC1* is now well-recognized as a tumor suppressor gene modulating p53-dependent apoptotic DNA damage responses through direct binding to the *SIRT1* promoter; cooperating with *Patched*, an inhibitor of the Hedgehog pathway to induce medulloblastomas and able to modulate the Wnt pathway.

Despite this significant progress, many basic questions remain unresolved. First, an incomplete picture exists for the mechanisms of transcriptional regulation by *HIC1*. Second and more importantly, the list of characterized target genes appears to be very short considering the large numbers of potential physiological roles of *HIC1*. A better knowledge of these target genes would also help to decipher the potentially numerous signaling pathways that could be deregulated through epigenetic inactivation of *HIC1*.

HIC1 is another example of a tumor suppressor gene silenced in cancer in association with promoter hypermethylation. As such, *HIC1* could by itself be a new target for epigenetic therapies through the combined use of pharmacologic DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylase inhibitors. Moreover, the identification of genes directly regulated by *HIC1* warrants a more in-depth investigation due to their potential use as therapeutic targets. For example, cambinol, a compound that inhibits the NAD-dependent deacetylase activity of *SIRT1* induces apoptosis of xenograft tumors *in vivo* derived from Burkitt's lymphomas overexpressing BCL-6, a transcription factor essential for B-cell fate and differentiation and deacetylated by *SIRT1* (Heltweg et al., 2006). It would be interesting to determine if cambinol could also trigger apoptosis in tumors with loss of *HIC1*.

Further characterizing *HIC1* function and its direct transcriptional targets would not only help to understand its role as a tumor suppressor gene and provide new insights into epigenetics and transcriptional repression in general but would also open new therapeutic approaches to major human cancers.

Acknowledgements

This review is dedicated to the memory of Christian Lagrou and Jean Coll.

CF and GB were supported by predoctoral fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche and from CNRS/Région Nord-Pas de Calais respectively. MT was supported by a post-doctoral fellowship from Association for International Cancer Research (AICR). Our work was supported by funds from CNRS, PASTEUR Institute of Lille, Ligue contre le Cancer (Comité Régional du Septentrion), ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer, Grant No. 3983) and Association for International Cancer Research (AICR). BR is supported by NINDS, NIH grant #1K08NS051477.

References

Ahmad KF, Engel CK, Prive GG. Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:12123–8.

- Ahmad KF, Melnick A, Lax S, Bouchard D, Liu J, Kiang CL, et al. Mechanism of SMRT corepressor recruitment by the BCL6 BTB domain. *Mol Cell* 2003;12:1551–64.
- Ahuja N, Mohan AL, Li Q, Stolker JM, Herman JG, Hamilton SR, et al. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:3370–4.
- Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein–protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ* 1995;6:1193–8.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107–16.
- Bertrand S, Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour-Balerdi S, Guerardel C, Begue A, et al. Identification and developmental expression of the zebrafish orthologue of the tumor suppressor gene *HIC1*. *Biochim Biophys Acta* 2004;1678:57–66.
- Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, et al. Cooperation between the *Hic1* and *Ptch1* tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev* 2008;22:770–85.
- Brienes VR, Chen S, Riegel AT, Lechleider RJ. Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF- β . *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:595–601.
- Britschgi C, Rizzi M, Grob TJ, Tschan MP, Hugli B, Reddy VA, et al. Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene *Hypermethylated in Cancer 1*. *Oncogene* 2006;25:2030–9.
- Britschgi C, Jenal M, Rizzi M, Mueller BU, Torbett BE, Andres AC, et al. *HIC1* tumour suppressor gene is suppressed in acute myeloid leukaemia and induced during granulocytic differentiation. *Br J Haematol* 2008;141:179–87.
- Carter MG, Johns MA, Zeng X, Zhou L, Zink MC, Mankowski JL, et al. Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:413–9.
- Chen WY, Zeng X, Carter MG, Morrell CN, Chiu Yen RW, Esteller M, et al. Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 2003;33:197–202.
- Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, et al. Epigenetic and genetic loss of *Hic1* function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004;6:387–98.
- Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor *HIC1* directly regulates *SIRT1* to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005;123:437–48.
- Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2007.
- Cornelis RS, van Vliet M, Vos CB, Cleton-Jansen AM, van de Vijver MJ, Peterse JL, et al. Evidence for a gene on 17p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumors without p53 mutations. *Cancer Res* 1994;54:4200–6.
- Deltour S, Guerardel C, Stehelin D, Leprince D. The carboxy-terminal end of the candidate tumor suppressor gene *HIC-1* is phylogenetically conserved. *Biochim Biophys Acta* 1998;1443:230–2.
- Deltour S, Guerardel C, Leprince D. Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of *HIC-1* and γ -FBP-B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14831–6.
- Deltour S, Pinte S, Guerardel C, Leprince D. Characterization of HRG22, a human homologue of the putative tumor suppressor gene *HIC1*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:427–34.
- Deltour S, Pinte S, Guerardel C, Wasyluk B, Leprince D. The human candidate tumor suppressor gene *HIC1* recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol Cell Biol* 2002;22:4890–901.
- DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000;408:248–54.
- Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Argenti B, Mincione C, Zazzeroni F, et al. *REN(KCTD11)* is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10833–8.
- Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3410–8.
- Eguchi K, Kanai Y, Kobayashi K, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D1755 locus in non-small cell lung cancers: its association with smoking history. *Cancer Res* 1997;57:4913–5.
- Ferretti E, De Smaele E, Di Marcotullio L, Screpanti I, Gulino A. Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm. *Trends Mol Med* 2005;11:537–45.
- Fujii H, Biel MA, Zhou W, Weitzman SA, Baylin SB, Gabrielson E. Methylation of the *HIC-1* candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* 1998;16:2159–64.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:947–56.
- Ghetu AF, Corcoran CM, Cerchiotti L, Bardwell VJ, Melnick A, Prive GG. Structure of a BCR corepressor peptide in complex with the BCL6 BTB domain dimer. *Mol Cell* 2008;29:384–91.
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse *patched* mutants. *Science* 1997;277:1109–13.
- Guerardel C, Deltour S, Pinte S, Monte D, Begue A, Godwin AK, et al. Identification in the human candidate tumor suppressor gene *HIC-1* of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem* 2001;276:3078–89.
- Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T. O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:765–74.
- Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 2005;18:1–12.

- Hayashi M, Tokuchi Y, Hashimoto T, Hayashi S, Nishida K, Ishikawa Y, et al. Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance. *Anticancer Res* 2001;21:535–40.
- Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* 2006;66:4368–77.
- Huang J, Hu N, Goldstein AM, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Roth MJ, et al. High frequency allelic loss on chromosome 17p13.3-p11.1 in esophageal squamous cell carcinomas from a high incidence area in northern China. *Carcinogenesis* 2000;21:2019–26.
- Inoue K, Zindy F, Randle DH, Reh J, Sherr CJ. Dmp1 is haplo-insufficient for tumor suppression and modifies the frequencies of Arf and p53 mutations in Myc-induced lymphomas. *Genes Dev* 2001;15:2934–9.
- Issa JP, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia* 1997a;11(Suppl. 1):S7–11.
- Issa JP, Zehnbauser BA, Kaufmann SH, Biel MA, Baylin SB. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1997b;57:1678–81.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683–92.
- Kanai Y, Ushijima S, Ochiai A, Eguchi K, Hui A, Hirohashi S. DNA hypermethylation at the D1755 locus is associated with gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 1998;122:135–41.
- Kanai Y, Hui AM, Sun L, Ushijima S, Sakamoto M, Tsuda H, et al. DNA hypermethylation at the D1755 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1999;29:703–9.
- Kelly KF, Daniel JM. POZ for effect—POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol* 2006;16:578–87.
- Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054–72.
- Koul S, Houldsworth J, Mansukhani MM, Donadio A, McKiernan JM, Reuter VE, et al. Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. *Mol Cancer* 2002;1:8.
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:301–13.
- Lefebvre T, Pinte S, Guerardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny MC, et al. The tumor suppressor HIC1 (*Hypermethylated in Cancer 1*) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem* 2004;271:3843–54.
- Liscia DS, Morizio R, Venesio T, Palenzona C, Donadio M, Callahan R. Prognostic significance of loss of heterozygosity at loci on chromosome 17p13.3-ter in sporadic breast cancer is evidence for a putative tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1999;80:821–6.
- Makos M, Nelkin BD, Lerman MI, Latif F, Zbar B, Baylin SB. Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1929–33.
- Makos M, Nelkin BD, Chazin VR, Cavenee WK, Brodeur GM, Baylin SB. DNA hypermethylation is associated with 17p allelic loss in neural tumors. *Cancer Res* 1993a;53:2715–8.
- Makos M, Nelkin BD, Reiter RE, Gnarr JR, Brooks J, Isaacs W, et al. Regional DNA hypermethylation at D1755 precedes 17p structural changes in the progression of renal tumors. *Cancer Res* 1993b;53:2719–22.
- Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Cancer-specific region of hypermethylation identified within the HIC1 putative tumour suppressor gene in acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 1999a;13:877–83.
- Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 1999b;59:3730–40.
- Mondal AM, Chinnadurai S, Datta K, Chauhan SS, Sinha S, Chattopadhyay P. Identification and functional characterization of a novel unspliced transcript variant of HIC-1 in human cancer cells exposed to adverse growth conditions. *Cancer Res* 2006;66:10466–77.
- Morton Jr RA, Watkins JJ, Bova GS, Wales MM, Baylin SB, Isaacs WB. Hypermethylation of chromosome 17P locus D1755 in human prostate tissue. *J Urol* 1996;156:512–6.
- Nicoll G, Crichton DN, McDowell HE, Kernohan N, Hupp TR, Thompson AM. Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001;85:1878–82.
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007;39:237–42.
- Pinte S, Guerardel C, Deltour-Balerdi S, Godwin AK, Leprince D. Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1. *Oncogene* 2004a;23:4023–31.
- Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour S, Rood BR, Guerardel C, Leprince D. The tumor suppressor gene HIC1 (*Hypermethylated in Cancer 1*) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem* 2004b;279:38313–24.
- Rathi A, Virmani AK, Harada K, Timmons CF, Miyajima K, Hay RJ, et al. Aberrant methylation of the HIC1 promoter is a frequent event in specific pediatric neoplasms. *Clin Cancer Res* 2003;9:3674–8.
- Rood BR, Zhang H, Weitman DM, Cogen PH. Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res* 2002;62:3794–7.
- Sakamoto T, Nomura N, Mori H, Wake N. Poor correlation with loss of heterozygosity on chromosome 17p and p53 mutations in ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 1996;63:173–9.
- Saunders LR, Verdin E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 2007;26:5489–504.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007;39:232–6.
- Shalizi A, Gaudilliere B, Yuan Z, Stegmuller J, Shirogane T, Ge Q, et al. A calcium-regulated MEF2 SUMOylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 2006;311:1012–7.
- Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 2007;8:263–71.
- Stankovic-Valentin N, Verger A, Deltour-Balerdi S, Quinlan KG, Crossley M, Leprince D. A L225A substitution in the human tumour suppressor HIC1 abolishes its interaction with the corepressor CtBP. *FEBS J* 2006;273:2879–90.
- Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C, et al. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 2007;27:2661–75.
- Stocklein H, Smardova J, Macak J, Katzenberger T, Holler S, Wessendorf S, et al. Detailed mapping of chromosome 17p deletions reveals HIC1 as a novel tumor suppressor gene candidate telomeric to TP53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2007;27:2613–25.
- Stogios PJ, Downs GS, Jauhal JJ, Nandra SK, Prive GG. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 2005;6:R82.
- Valenta T, Lukas J, Doubravska L, Faflek B, Korinek V. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J* 2006;25:2326–37.
- Verger A, Perdomo J, Crossley M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 2003;4:137–42.
- Waha A, Waha A, Koch A, Meyer-Puttitz B, Weggen S, Sorensen N, et al. Epigenetic silencing of the HIC-1 gene in human medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1192–201.
- Waha A, Koch A, Hartmann W, Mack H, Schramm J, Sorensen N, et al. Analysis of HIC-1 methylation and transcription in human ependymomas. *Int J Cancer* 2004;110:542–9.
- Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570–7.
- Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res* 2001;61:513–6.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007;39:157–8.
- Zhang Q, Wang SY, Fleuriet C, Leprince D, Rocheleau JV, Piston DW, et al. Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:829–33.