



**HAL**  
open science

# Etude de la SUMOylation dans l'immunité innée et l'oncogenèse

Adrien Decque

► **To cite this version:**

Adrien Decque. Etude de la SUMOylation dans l'immunité innée et l'oncogenèse. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066312 . tel-01372202

**HAL Id: tel-01372202**

**<https://theses.hal.science/tel-01372202v1>**

Submitted on 3 Nov 2016

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : Complexité du Vivant

*Unité Organisation Nucléaire et Oncogénèse*

## **Etude de la SUMOylation dans l'immunité innée et l'oncogénèse**

Par Adrien Decque

Thèse de doctorat de SCIENCES, SANTE et APPLICATIONS

Dirigée par Anne Dejean

Présentée et soutenue publiquement le 26 Septembre 2014

Devant un jury composé de :

M. Jean-Charles GUERY

Rapporteur

M. Stefan Müller

Rapporteur

Mme Fatima MECHTA-GRIGORIOU

Examinatrice

M. Guillaume BOSSIS

Examinateur

Mme Isabelle CREMER

Présidente

Mme Anne DEJEAN

Directrice de thèse



## Remerciements

Je remercie les membres du jury : *Stefan Müller, Jean-Charles Guéry, Guillaume Bossis, Fatima Mechta-Grigoriou, et Isabelle Cremer*, qui me font l'honneur de juger mon travail à l'occasion de cette soutenance.

Je remercie *Anne Dejean*, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire il y a quatre ans, sur un coup de téléphone du bout du monde. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir placé dans des conditions de travail exceptionnelles, de m'avoir aiguillé sur des collaborations de qualité et de m'avoir accompagné jusqu'ici. Merci d'avoir été une chef hors du commun.

Je remercie les membres passés et présents de l'équipe ONO.

Merci à ceux qui ont partagé avec moi la pièce 305 : *Sabrina*, ma colocataire de bureau pendant 2 ans ; *Maud*, qui m'a mis sur les rails lorsque je suis arrivé au labo ; *Alexandra*, qui en plus d'être toujours de bonne humeur m'a quasiment tout appris sur l'élevage de souris et qui a effectué un travail de titan pour faire de nos projets animaux des réalités ; *Jacob*, pour les discussions alambiquées sur la science et sur le football ; *Pierre*, à qui le nombre de choses pour lequel je le remercie aurait mérité de figurer en annexe 8 de ce manuscrit. Merci pour avoir grandement contribué à la super ambiance du labo, pour avoir partagé un bout de projet avec moi, pour m'avoir laissé gagner tant de fois aux contests, pour les soirées pizza au labo, pour les soirées Oldarki, pour notre goût partagé des téléviseurs à écran large, les innombrables bons moments, et la relecture de ce manuscrit. Merci enfin à *Jack*, ou Dejacques, pour presque toutes les mêmes choses que Pierre, les sessions foot du lundi matin, les matchs de Ligue des Champions, les WTF, les JO (surtout le Taekwondo), le Tour, m'avoir laissé gagner aux contests, le baby, ta descente de toit chez Lise, et surtout ton aide inestimable sur la fin de ma thèse. Merci enfin pour la convivialité des pauses café. Coucou !

Merci à ceux qui n'ont pas partagé avec moi la pièce 305, mais qui sont gentils quand même ! *Oliver, Greg et Ricardo*, nos voisins, *Ying, Pablo et Elma*, nos voisins éloignés fraîchement arrivés, *Pierre Tiollais*, pour l'ambiance et les séminaires. Merci *Thibaut* de venir le dimanche. Merci à *Agnès*, pour ton aide et ta bonne humeur. Merci à *Pascal*, pour tes idées

tranchées, ton franc-parler, tes analyses footballistiques, tes conseils touristiques. Merci à vous deux pour le projet que nous avons partagé.

Un merci particulier à *Louise-Marie* et *Florence*, qui nous accompagnent tous les jours dans les galères administratives. Merci pour votre gentillesse, votre calme et votre patience.

Je remercie également les amis du 3<sup>e</sup>, qui seraient trop longs à énumérer. Un merci particulier à *Jennifer*, *Aurélie* et *Lisette* pour leur soutien au cours de ma thèse, la bonne ambiance, les soirées n'importe quoi. Vous êtes chouettes !

Je remercie les collègues de Curie, *Olivier* et *Joao*, pour leur accueil, leur travail, et ce beau projet que nous avons mené ensemble.

Je remercie tous les amis que j'ai eu la chance d'avoir sur mon chemin pendant mes études de pharma et à l'ENS. Vous m'avez aidé à arriver jusque-là. Merci à *Pierre* de m'avoir mis en selle pour l'aventure qu'est la recherche.

Un merci géant pour ma famille. *Papa*, *Maman*, merci d'avoir toujours été derrière moi, merci pour vos sacrifices qui m'ont permis d'en arriver là, merci de m'avoir donné cette vie. Je vous aime. Merci à *mes grands-parents* de m'avoir accueilli à mes débuts. *Aline*, *Momo*, *Clarisse*, *Justine* et *Elise*, merci pour les moments extraordinaires que vous m'offrez à chaque fois que je reviens à la maison, ils ont immensément contribué à mon parcours, en me donnant le moral. Merci enfin à ma *belle-famille* en or, qui a aussi grandement contribué à mon moral.

Enfin, merci à *Emeline*. Sans toi, rien n'aurait été possible, et je me demande bien où je serais aujourd'hui si je ne t'avais jamais rencontrée. Merci pour ton soutien sans faille, tes sacrifices quotidiens pour moi, ton rire, et pour le bonheur que tu me donnes tous les jours.

## Collaborations

Je remercie tous les scientifiques excellents avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Sebastian Amigorena, Olivier Joffre et Joao Magalhaes de l'Institut Curie, qui ont partagé mon travail dès les premiers jours et qui ont grandement contribué à sa réussite.

Ido Amit et Ronnie Blecher-Gonen du Weizmann Institute of Science, qui m'ont accueilli à deux reprises et m'ont apporté leur expertise du ChIP-Seq.

Matthew Albert et Pierre-Emmanuel Joubert, ainsi que Marco Vignuzzi et Stéphanie Beaucourt de l'Institut Pasteur, pour leur expertise en virologie.

Irwin Davidson et Céline Keime de l'IGBMC de Strasbourg, pour leurs coups de pouce en bioinformatique.

Benoît Terris, de l'Hôpital Cochin, pour le travail sur le carcinome colorectal.

Grégory Jouvion, de l'équipe Histopathologie humaine et modèles animaux à l'Institut Pasteur.

Et les nombreux autres scientifiques avec qui j'ai pu discuter au cours de ma thèse et qui ont aidé à son aboutissement.

## Liste des abbréviations

4OHT	4-hydroxytamoxifène
ADN	Acide désoxyribonucléique
AOM	Azoxymethane
ARN	Acide ribonucléique
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cells
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
CHIP	Chromatin-immunoprecipitation
CHIP SEQ	Chromatin-immunoprecipitation - sequencing
CRC	Carcinome colorectal
DHS	DNase Hypersensitivity Site
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSS	Dextran Sodium Sulfate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Regulated Kinase
ERV	Endogenous retrovirus
GM6CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H3K27AC	Histone 3 Lysine 27 acetyl
H3K4ME1	Histone 3 Lysine 4 monomethyl
H3K4ME3	Histone 3 Lysine 4 trimethyl
IFN	Interféron
IKBA	Inhibitor of kappa-b alpha
IKK	IkB Kinase
IMDM	Iscove Modified Dulbecco's Medium
ISG	Interferon Stimulated Genes
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	Long Terminal repeats
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MPT	Modifications Post-traductionnelles
NFKB	nuclear factor kappa b
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STATs
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RT QPCR	Reverse-transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction
SENP	Sentrin Protease
SIM	SUMO - interacting domain
STAT	Signal Transduced Activation Transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TF	Transcription Factor
TLR	Toll-Like Receptor
TSS	Transcription Start Site
TTS	Transcription Termination Site

UBC9	Ubiquitin Conjugating 9
UBL	Ubiquitin-like
USBD	Upstream SUMO Binding Domain
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WT	Wild-type



# Sommaire

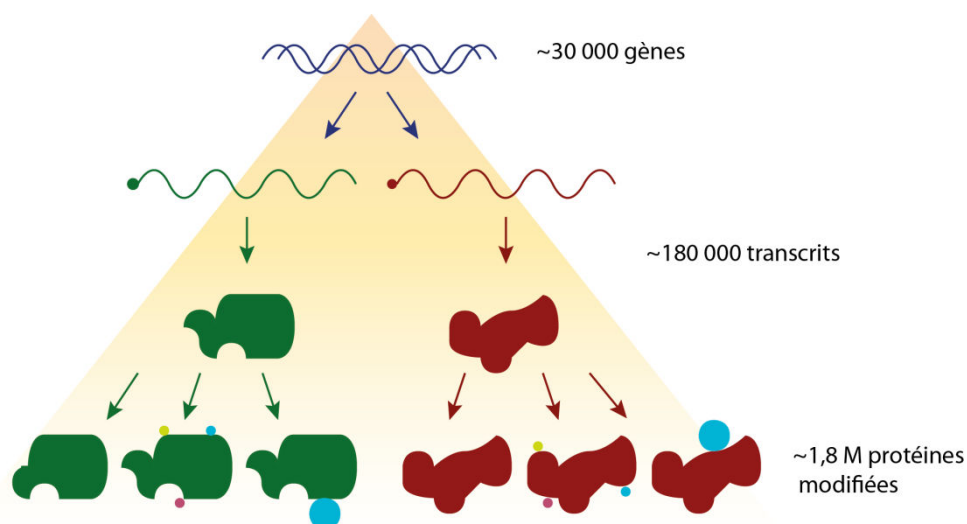
Remerciements .....	3
Collaborations .....	5
Liste des abbréviations .....	6
Sommaire .....	8
Introduction .....	10
I. Les modifications post-traductionnelles.....	11
A. Diversité biochimique des modifications post-traductionnelles.....	12
B. L'ubiquitination .....	12
C. Autres modifications post-traductionnelles .....	16
II. La SUMOylation .....	19
A. Introduction à la modification par SUMO.....	19
B. Les paralogues de SUMO.....	20
C. Mécanisme de modification par SUMO .....	22
a. Apport de SUMO libre .....	23
b. Activation par l'enzyme E1 .....	25
c. Conjugaison par l'enzyme E2.....	25
d. Ligation de SUMO par les enzymes E3 ligases.....	26
e. Séquences régulatrices de la SUMOylation .....	29
D. Régulation de la SUMOylation .....	31
a) Régulation de la SUMOylation par d'autres modifications post-traductionnelles	32
b) Régulation par changement conformationnel .....	34
c) Régulation globale par un stress .....	35
d) Régulation exogène de la SUMOylation .....	36
E. Conséquences de la SUMOylation sur les protéines .....	39
III. Rôles fonctionnels de la SUMOylation.....	45
A. Rôles de SUMO révélés par génie génétique .....	45
B. SUMO et immunité innée.....	47
a) Généralités sur l'immunité innée .....	47
b) Macrophages et cellules dendritiques orchestrent la réponse aux pathogènes .....	48
c) Contrôle de la voie NF- $\kappa$ B par la SUMOylation .....	50
d) Contrôle de la voie IRF par la SUMOylation .....	53
e) La voie des MAPK est contrôlée par la SUMOylation.....	55
f) La famille des PIAS, SUMO E3 ligases et inhibitrices de l'immunité innée.....	56
g) SUMOylation et activité anti-inflammatoire des récepteurs nucléaires .....	58
h) Régulation transcriptionnelle par SUMO à la chromatine.....	59
C. SUMO et cancer .....	63
a) Associations physiopathologiques .....	63
b) SUMO et dommages à l'ADN.....	66
c) La SUMOylation est importante dans l'angiogenèse .....	68
d) Relations entre la SUMOylation et les oncogènes et suppresseurs de tumeurs.....	69
e) Etude du rôle physiopathologique de la SUMOylation dans le cancer du côlon...	71
IV. Objectifs généraux de la thèse.....	74
Résultats .....	75
I. Caractérisation du rôle de la SUMOylation dans l'immunité innée .....	76
A. Préambule .....	76
B. Article .....	77

C.	Perspectives .....	128
II.	SUMOylation et cancer .....	129
A.	Préambule .....	129
B.	Résultats.....	129
a)	La perte d' <i>Ubc9</i> bloque la prolifération cellulaire.....	129
b)	La perte d' <i>Ubc9</i> affecte le processus de transformation par Ras oncogénique ...	131
c)	La SUMOylation est essentielle pour les cellules transformées.....	132
d)	La perte d' <i>Ubc9</i> affecte le cycle cellulaire .....	133
e)	<i>Ubc9</i> et le modèle APC de cancer colorectal.....	135
f)	L'hétérozygotie pour <i>Ubc9</i> diminue la sensibilité des souris à la carcinogénèse colorectale .....	138
g)	L'hétérozygotie pour <i>Ubc9</i> diminue la sensibilité des souris à la carcinogénèse colorectale sur terrain inflammatoire .....	140
h)	<i>Ubc9</i> est induit dans les polypes intestinaux .....	142
i)	La perte d'un allèle d' <i>Ubc9</i> ne modifie pas la sensibilité au DSS .....	143
j)	Sensibilité des cellules hétérozygotes pour <i>Ubc9</i> aux dommages à l'ADN.....	147
k)	La SUMOylation est induite dans les cancers colorectaux humains .....	149
l)	Les profils transcriptionnels associés à la SUMOylation marquent les échantillons tumoraux.....	150
C.	Discussion et perspectives .....	151
	Conclusion.....	155
	Matériel et méthodes .....	158
	Bibliographie .....	164
	Annexes.....	191
	ANNEXE 1 .....	192
	ANNEXE 2 .....	198
	ANNEXE 3 .....	204
	ANNEXE 4 .....	223
	ANNEXE 5 .....	224
	ANNEXE 6 .....	225
	ANNEXE 7 .....	227
	Liste des illustrations.....	229
	Liste des tableaux .....	230

# **Introduction**

## I. Les modifications post-traductionnelles

Le génome humain comporte environ 30 000 gènes codant pour des protéines. Ce n'est pas suffisant pour expliquer l'immense diversité du protéome, dont le potentiel est estimé à 1,8 millions de protéines différentes (Jensen, 2004). L'évolution a donc sélectionné des mécanismes permettant de multiplier le nombre de protéines associées à chaque gène (figure 1). Le premier mécanisme consiste en l'existence de promoteurs et d'épissage alternatifs des transcrits. Ainsi, pour un seul gène, le nombre d'ARNm (ARN messager) transcrits est augmenté par la possibilité d'interchanger différents exons. Ceci aboutit à une moyenne de 5 à 6 transcrits différents par gène. Le second repose sur les modifications post-traductionnelles des protéines, modifications combinables entre elles. Ainsi, pour une protéine, on dénombre jusqu'à 10 formes différentes selon les modifications apportées (Jensen, 2004).



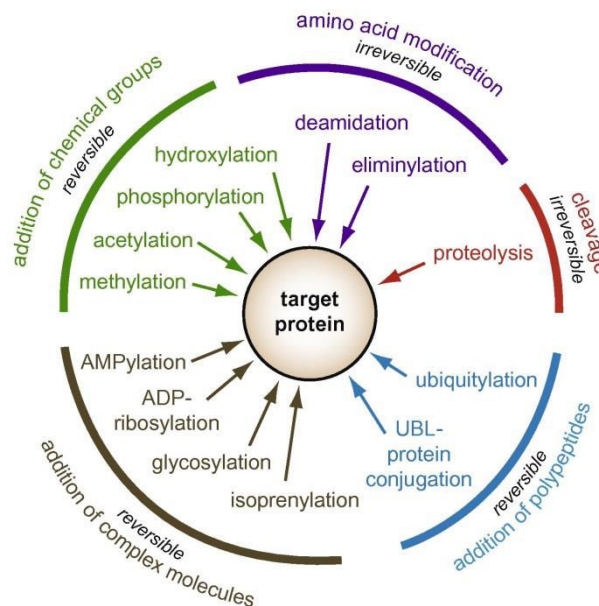
**Figure 1 La complexité et la dynamique du protéome généré par l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles.** Les promoteurs et l'épissage alternatif permet la diversification des transcrits et des protéines produites à partir d'un seul gène. Les modifications post-traductionnelles permettent d'étendre cette diversité et de réguler de manière dynamique les fonctions associées aux protéines. D'après (Jensen, 2004).

Les modifications post-traductionnelles sont la base des cascades de signalisation. Leur caractère bien souvent réversible et leur capacité à modifier la vie d'une protéine, particulièrement sa fonction, sa localisation ou sa stabilité, les place au cœur de systèmes dynamiques permettant une réponse rapide et l'intégration adéquate et précise de signaux intra- ou extra-cellulaires (Mowen and David, 2014).

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'impact d'une modification post-traductionnelle, la SUMOylation, sur les processus physiopathologiques à fort intérêt pour la santé que sont l'immunité innée et le cancer.

## A. Diversité biochimique des modifications post-traductionnelles

Plus de trois cents modifications post-traductionnelles sont décrites à ce jour. Elles incluent l'ajout de groupements chimie ou de polypeptides, ciblant 15 acides aminés différents, ou le clivage de précurseurs (figure 2). Une même protéine peut être modifiée sur plusieurs de ses acides aminés, par des groupes de nature différente. De plus, chacune des modifications est capable d'influer sur les autres, créant un véritable réseau et une complexité de régulation considérable (Ribet and Cossart, 2010).



**Figure 2 Diversité des modifications post-traductionnelles.** Une protéine peut être modifiée de façon réversible par addition d'un groupement chimie, de molécules complexes ou de polypeptides, ou de manière irréversible par clivage ou soustraction de groupements chimiques d'un acide aminé. D'après (Ribet and Cossart, 2010).

## B. L'ubiquitination

L'ubiquitination est la première modification peptidique ayant été décrite. Elle se démarque des modifications abordées précédemment, puisqu'elle consiste en l'ajout d'un peptide, l'ubiquitine, sur une protéine cible.

Initialement découverte par Goldstein *et al.* en 1975 (Goldstein et al., 1975), ce n'est qu'à la fin des années 1970 et au début des années 1980 que les travaux de Hershko, Ciechanover et Rose ont permis la caractérisation de la cascade enzymatique complexe permettant cette modification. Fonctionnellement, lesdits travaux ont associé la polyubiquitination des protéines à leur dégradation par le protéasome, et ceci a été récompensé par le Prix Nobel de Chimie en 2004 (Hershko et al., 1979, 1980, 1981). Nous savons désormais que l'ubiquitination a une multitude de fonctions dans la cellule en dehors de l'homéostasie des protéines.

L'ubiquitine est présente en abondance dans toutes les cellules de l'organisme, ce qui lui a valu son nom. Elle est encodée par 4 gènes différents chez tous les organismes eucaryotes étudiés, ce qui reflète son importance capitale dans la vie de la cellule eucaryote. Chez la souris et chez l'Homme, les gènes *Uba52* et *Rps27a* codent pour des protéines de fusions entre l'ubiquitine et des protéines ribosomales, et sont exprimés de manière constitutive. Les gènes *Ubb* et *Ubc* codent pour des polyprotéines d'ubiquitine et sont induites lors d'un stress cellulaire. Des études récentes ont néanmoins montré l'importance de ces gènes, leur délétion génétique étant létale au niveau embryonnaire pour *Ubc* (Ryu et al., 2007), ou causant une infertilité mâle et femelle ainsi qu'une neurodégénérescence pour *Ubb* (Ryu et al., 2008).

La cascade d'ubiquitination commence par la maturation de l'ubiquitine grâce au clivage de sa partie C-terminale, exposant un résidu glycine dans sa forme mature.

L'enzyme E1 (UBE1 chez la souris et l'Homme), est l'enzyme dite « activatrice ». Elle forme une liaison thioester de haute énergie entre sa cystéine réactive et la glycine C-terminale de l'ubiquitine, suivant une réaction ATP-dépendante. A ce jour, deux E1 d'ubiquitination ont été décrites chez les mammifères.

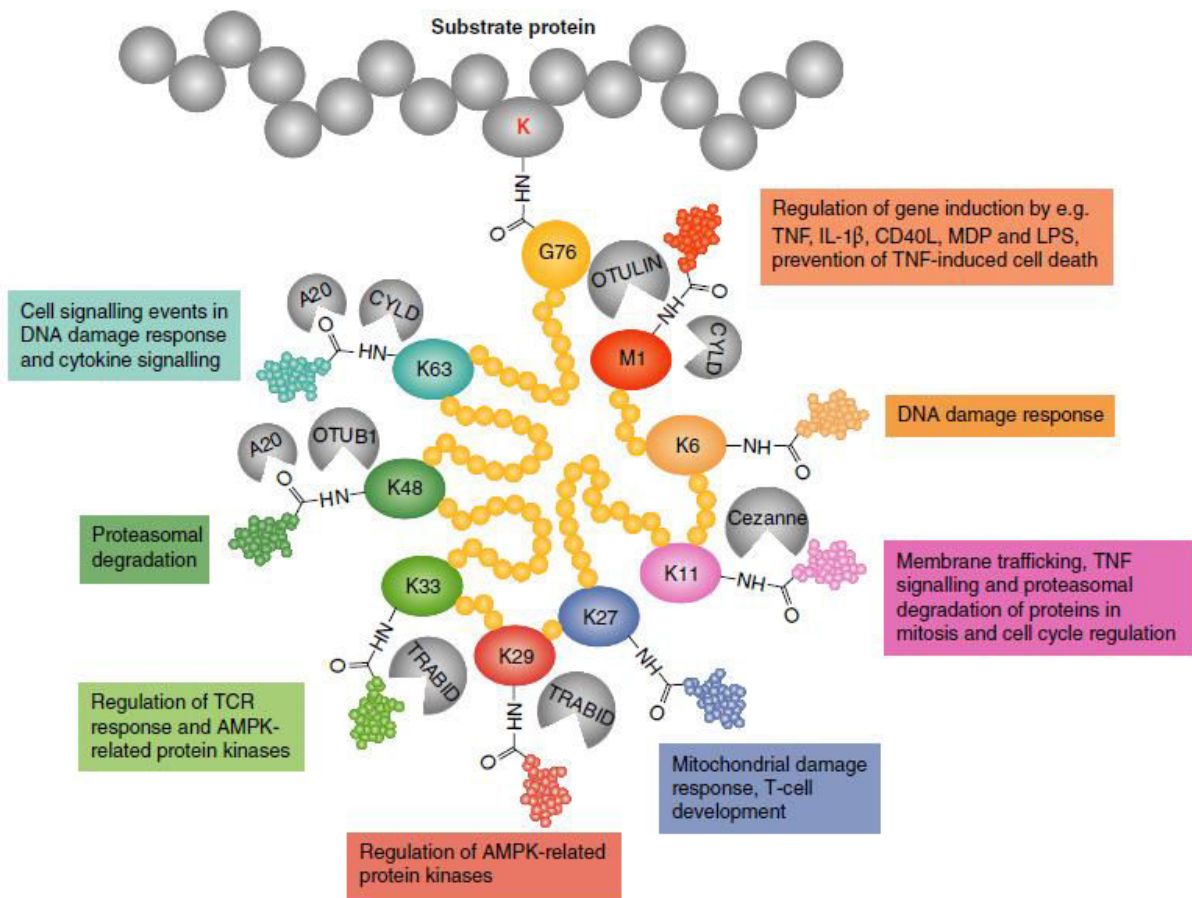
L'ubiquitine est alors transférée à l'enzyme E2, dite « de conjugaison », avec laquelle elle forme également une liaison thioester. Il existe plusieurs dizaines d'enzymes E2.

Dans certains cas, l'enzyme E2 peut elle-même modifier une protéine cible, mais cette étape requiert la plupart du temps l'intervention d'une enzyme E3, dite « ubiquitine-ligase ». Elle aboutit à la formation d'une liaison peptidique entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et la lysine acceptrice de la protéine substrat.

Enfin, et de manière importante, l'ubiquitination est une réaction réversible. En effet, des enzymes dites « déubiquitinases » ou DUB, permettent le clivage de la liaison peptidique,

et le recyclage de l'ubiquitine. Ces mêmes enzymes sont impliquées dans la première étape du cycle, la maturation de l'ubiquitine (Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996).

La protéine ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés (8,5kDa) dont la structure secondaire, comprenant 5 feuillets beta arrangés en forme globulaire compacte, est caractéristique et partagée par les protéines « Ubiquitin-like » ou UBL qui seront abordées dans la suite de ce manuscrit (Hochstrasser, 2009). Sa séquence peptidique comprend de plus des éléments cruciaux pour la formation des chaînes d'ubiquitines : sa glycine C-terminale, sept lysines (en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 68) ainsi que la méthionine N-terminale. Bien que la mono-ubiquitination d'une protéine cible est possible et importante pour de nombreux processus cellulaires, tels que l'endocytose et la transcription (Hicke, 2001; Weake and Workman, 2008), la polyubiquitination sous forme de chaînes lui confère toute sa complexité. En effet, il est désormais établi que le branchement majeur impliqué dans la dégradation par le protéasome est en lysine 48 (K48). Les autres formes de branchement confèrent une multitude de fonctions dont une partie concernant l'immunité est résumée figure 3.



**Figure 3 Ubiquitine et immunité : importance fonctionnelle des types de branchement de l'ubiquitine.** L'ubiquitine peut former différents types de chaînes selon l'acide aminé utilisé pour le branchement. Chaque type de chaîne a une importance démontrée dans différents mécanismes nécessaire à l'immunité.

A titre d'exemple le branchement sur la protéine TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) de chaînes en K63 est essentiel à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) suite à l'engagement du TLR (Toll-Like Receptor) 4 par le lipopolysaccharide (LPS). De même, le branchement de chaînes linéaires – soit directement de la méthionine N-terminale d'une ubiquitine à la glycine C-terminale de la suivante – est essentiel au fonctionnement de cette même voie en modifiant notamment la kinase NF- $\kappa$ B Essential Modulator (NEMO) (Zinngrebe et al., 2014).

La spécificité de substrat et de type de branchement est apportée à la fois par les enzymes E2 mais aussi par les enzymes E3. Ainsi, si quelques dizaines d'enzymes E2 ont été décrites, plusieurs centaines d'enzymes E3 ont été caractérisées à ce jour. Celles-ci sont



regroupées en trois familles, selon le domaine E3-ligase qu'elles comprennent et qui détermine leur mécanisme d'action (Zinngrebe et al., 2014) :

Les E3 ligases à domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus), forme dans un premier temps une liaison covalente avec l'ubiquitine, avant de la transférer sur le substrat.

Les E3 ligases à domaine RING (Really Interesting New Gene) sont capables de catalyser le transfert direct de l'ubiquitine depuis la cystéine de la E2 à la lysine de la protéine cible, en favorisant leur rapprochement.

Les E3 ligases dites RBR (RING-Between-RING), possèdent deux domaines RING espacés l'un de l'autre, et leur fonctionnement est un hybride des deux précédents. Le premier domaine RING rapproche l'enzyme E2 chargée du deuxième domaine RING, provoquant le transfert de l'ubiquitine vers celui-ci. Le second domaine RING va alors transférer l'ubiquitine sur le substrat.

L'ubiquitination d'une protéine cible peut avoir de nombreuses conséquences. L'ubiquitine ou la chaîne d'ubiquitines ajoute une nouvelle surface sur la protéine cible, lui permettant d'interagir avec de nouveaux partenaires. Cette interaction est rendue possible grâce aux domaines d'interaction avec l'ubiquitine, ou UBD (Ubiquitin Binding Domain), portés par les protéines partenaires. Ces UBD permettent la reconnaissance spécifique du branchement de l'ubiquitine sur le substrat. C'est le cas par exemple de certaines sous-unités du protéasome, qui reconnaissent les chaînes polyubiquitines en K48 (Hicke et al., 2005).

L'ubiquitination et la protéolyse associée sont impliquées dans de nombreuses pathologies, et a fait l'objet d'abondantes recherches ayant mené, dans certains cas, à une utilisation clinique. C'est notamment le cas de l'inhibiteur du protéasome bortezomib, utilisé en clinique dans le cadre du myélome multiple et du lymphome du manteau. L'implication de l'ubiquitination dans des processus cellulaires clés tels que l'apoptose ou l'inflammation en fait une cible pertinente dans les maladies inflammatoire, les maladies neurodégénératives et certains cancers (Vucic et al., 2011).

### **C. Autres modifications post-traductionnelles**

Depuis la découverte de l'ubiquitine, une quantité importante de protéines apparentées a été découverte. Ces protéines présentent une faible homologie de séquence entre elles,

ubiquitine comprise, mais une remarquable similarité à la fois dans leur structure secondaire (forme globulaire à feuillets  $\beta$ ), ainsi que dans la cascade enzymatique permettant la modification. De part ces similarités, elles ont été regroupées sous l'appellation UBL ou « Ubiquitin-Like proteins ». Il en existe à ce jour une vingtaine, récapitulée dans la table 1, les plus étudiées seront décrites ci-dessous.

**Table 1 : Modification post-traductionnelles apparentées à l'ubiquitine (UBL). D'après (van der Veen and Ploegh, 2012)**

Modificateur	Identité avec l'ubiquitine	E1	E2	E3	Protéase(s)	Fonction(s)
Ubiquitine	100	UBE1/ UBA6	>37	>600	~80	Multiples, dépendantes du type de liaison, historiquement dégradation protéasome-dépendante
SUMO1-4	~15%	SAE1/ SAE2	UBC9	~15	SENPI-3, 5-7	Surface d'interaction avec partenaires modifiant fonction, localisation, stabilité
NEDD8	58	NAE1 UBA3	UBC12, UBE2F	~10	CSN5, NEDP1	Régulation de l'ubiquitination, cycle cellulaire
MNSF $\beta$	36					Inconnu, régulateur de l'immunité ?
ISG15	28	UBE1L	UBCH8, UBCH6	HERC5	USP18	Immunité antiviral
FAT10	27	UBA6	USE2			Dégradation indépendante du protéasome
UFM1	23	UBA5	UFC1	UFL1	UFSP1, UFSP2	Développement érythroïde et mégakaryocytaire
ATG12	12	ATG7	ATG10			Autophagie, homéostasie mitochondriale
URM1	17	MOCS3				Thiolation des tRNA
MAP1LC3A	9	ATG7	ATG3	ATG12, ATG5, ATG16L	ATG4A-D	Formation des autophagosomes, autophagie sélective par interaction avec les récepteurs de l'autophagie
MAP1LC3B	13					
MAP1LC3C	10					
GABARAP	8					
GABARAPL1	12					
GABARAPL2	14					

Historiquement, le premier UBL à avoir suivi la découverte de l'ubiquitine est ISG15 (Interferon Stimulated Gene 15). Le gène *Isg15* est induit en réponse aux interférons de type I, et des études ont démontré son rôle crucial dans la réponse antivirale. En effet, les souris *Isg15*<sup>-/-</sup> ont une sensibilité accrue aux virus Influenza A, Influenza B, HSV-1 et Sindbis (Lenschow et al., 2007). De la même manière que l'ubiquitine, ISG15 peut être ajouté sur des protéines cibles par l'intermédiaire d'enzymes E1, E2 et E3. Des protéines cellulaires et virales peuvent être modifiées par ISG15, et leur modification participe à la réponse antivirale. C'est notamment le cas du répresseur de la traduction 4EHP, dont l'ISGylation augmente l'affinité pour la coiffe en 5' des ARN messagers (ARNm), inhibant ainsi la traduction des ARNm viraux comme cellulaires. Citons également l'exemple du facteur de transcription IRF3, facteur clé dans la réponse interféron de type I et dont l'ISGylation améliore la stabilité, en empêchant son interaction avec l'E3 ubiquitine ligase PIN1 et donc sa polyubiquitination (van der Veen and Ploegh, 2012).

Un autre exemple d'UBL est le modificateur NEDD8. C'est le modificateur qui partage la plus grande homologie de séquence avec l'ubiquitine (58%). Son rôle est essentiel chez les eucaryotes puisque la délétion de *Nedd8* est létale dans tous les organismes étudiés excepté *S. cerevisiae*. Les substrats majeurs de la neddylation sont les protéines de la famille des Cullins, qui sont des protéines adaptatrices essentielles à la formation de complexes E3 ligases de la famille RING (CRL, Cullin-RING-ligase). La neddylation est donc intimement liée à l'ubiquitination et au système de dégradation par le protéasome. La neddylation des Cullins permet l'exposition du domaine RING et son rapprochement de l'enzyme E2, essentiel à la ligation de l'ubiquitine sur la protéine cible. Une mutation des Cullins empêchant leur neddylation conduit au dysfonctionnement du complexe E3 ligase et à l'accumulation des protéines cibles du complexe (van der Veen and Ploegh, 2012). Il est intéressant de noter que l'inhibition pharmacologique de l'enzyme E1 de neddylation conduit à la non-dégradation des cibles des CRL. Celles-ci comprenant des régulateurs du cycle cellulaire, l'inhibition de la neddylation conduit à l'abolition de division cellulaire et constitue donc une cible prometteuse pour le traitement de certains cancers (Soucy et al., 2010).

Les protéines « Ubiquitin-like », leur mécanisme de modification de protéines cibles et les conséquences pour les protéines modifiées sont donc des phénomènes répandus chez les Eucaryotes, et à l'importance capitale dans le fonctionnement normal et pathologique de la cellule. Cette thèse a pour objectif de participer à mettre en évidence l'importance de l'une d'elle, la SUMOylation, dans l'immunité innée et dans l'oncogenèse.

## II. La SUMOylation

### A. Introduction à la modification par SUMO

La modification par SUMO (Small Ubiquitin-Like Modifier) a été découverte et caractérisée dans la seconde partie des années 1990. Elle suscite un grand intérêt par ses fonctions essentielles dans la cellule. En effet, on retrouve SUMO dans tous les organismes eucaryotes étudiés, de *Saccharomyces cerevisiae* à *Homo Sapiens*. Elle a été découverte chez la levure, dans un crible génétique pour des suppresseurs du phénotype de la mutation de *Mif2* (Mitotic Fidelity of chromosome transmission protein 2), ce qui lui valut son nom initial *Smt3p* (Suppressor of Mif Two temperature-sensitive mutant 3 protein) (Meluh and Koshland, 1995). L'année suivante, le gène humain *Sumo1* a été cloné, nommé pour l'occasion *hSmt3*, puis impliqué dans plusieurs processus cellulaires importants grâce à des cribles double hybride : réparation de l'ADN *via* RAD51 et RAD52, composant des corps nucléaires PML (ProMyelocytic Leukemia protein), apoptose induite par FAS et TNF (Boddy et al., 1996; Okura et al., 1996; Shen et al., 1996). En 1997, la liaison covalente, ATP-dépendante et réversible de *Smt3* à RanGAP1 (Ran GTPase Activating Protein 1) a été démontrée, et le nom SUMO1 a été introduit pour la première fois (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996).

Les eucaryotes unicellulaires comme la levure ou invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* ou *Drosophila Melanogaster* ne possèdent qu'un gène pour SUMO, et celui-ci est essentiel à la viabilité cellulaire. Les eucaryotes dits supérieurs tels que les plantes et les vertébrés expriment plusieurs versions. Ainsi le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 8 gènes codants pour des paralogues de SUMO (Kurepa et al., 2003). Chez l'Homme, on dénombre quatre gènes pour la protéine SUMO, trois chez la souris. SUMO1 partage environ 20% d'identité avec l'ubiquitine, SUMO2 et 3 sont à 97% identiques entre eux mais ne partagent que 50% d'identité avec SUMO1 (Hay, 2005). La forte identité entre SUMO2 et SUMO3 et l'impossibilité de les différencier leur valent d'être couramment désignés par la contraction SUMO2/3. Enfin SUMO4 partage 87% d'identité avec SUMO2 (figure 4) (Owerbach et al., 2005).



**Figure 4** Alignement des quatre paralogues de SUMO chez l’Homme. Acide aminé en noir à gris clair : degré de conservation entre les espèces (noir : très conservé ; gris : moins conservé ; blanc : peu conservé). D’après (Guo et al., 2004)

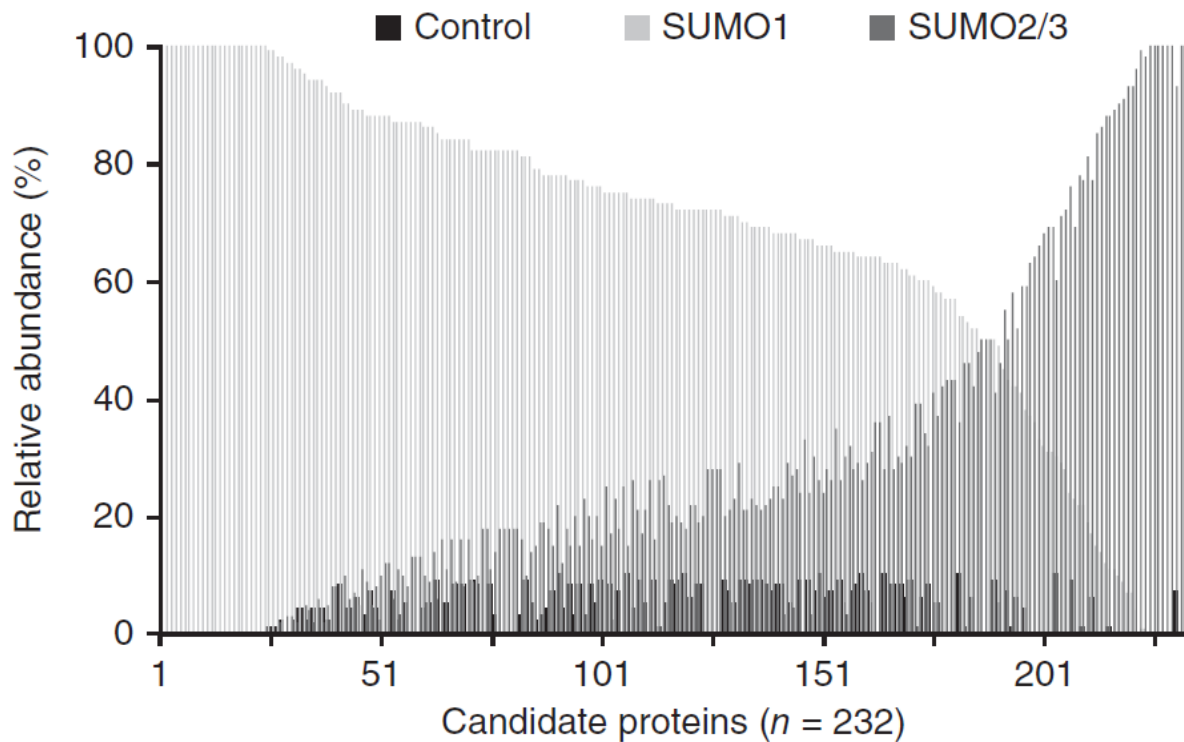
## B. Les paralogues de SUMO

SUMO est un peptide modificateur dit « Ubiquitin-like ». Comme indiqué précédemment, les peptides SUMO ne partagent qu’une faible identité de séquence avec l’ubiquitine. En revanche, leurs structures tridimensionnelles sont très proches et ils adoptent une forme globulaire compacte de type  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ , avec un motif di-Glycine en C-terminal permettant la liaison peptidique avec une lysine du substrat.

La structure des peptides SUMO se distingue par une extension N-terminale dans la direction opposée à celle de l’extrémité C-terminale. La plupart des sites de SUMOylation sur les protéines acceptrices correspondent à un motif  $\psi$ KxE/D, où  $\psi$  est un acide aminé hydrophobe, K est la lysine modifiable, x est n’importe quel acide aminé et E/D est un glutamate ou un aspartate. De tels sites de SUMOylation sont retrouvés dans la queue N-terminale de SUMO2 et 3, indiquant la possibilité de former des chaînes de SUMO *via* un branchement par ces lysines. De telles chaînes ont été décrites à la fois *in vitro* et *in vivo*. SUMO1 est dépourvu de ce motif et n’est donc impliqué que dans la terminaison des chaînes poly-SUMO ou dans la mono-SUMOylation (Tatham et al., 2001). Ce motif de SUMOylation est fortement conservé chez la levure, la souris et l’Homme (Tang et al., 2008). Enfin, une analyse protéomique récente a identifié d’autres sites de branchement sur SUMO2/3 (K5 and K7). Ces branchements apparaissent de manière simultanée avec le branchement majeur en K11, suggérant la possibilité pour SUMO2 et 3 de former des branchements « en arbre » en plus de former des chaînes (Tammsalu et al., 2014).

Les paralogues de SUMO se distinguent également par une certaine spécificité de substrat. Ainsi, une étude protéomique par Vertegaal *et al.* a permis l’identification de 53 substrats de SUMOylation. Parmi ceux-ci, 25 présentaient une forte préférence pour SUMO1, 19 pour SUMO2, et 9 étaient indifféremment modifiés par l’un ou l’autre (Vertegaal et al., 2006). De manière intéressante, les substrats identifiés étaient majoritairement nucléaires, et incluait notamment des régulateurs transcriptionnels (famille des Zfp ou Zinc finger protein) et des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l’ADN. Plus

récemment, une nouvelle étude protéomique réalisée sans surexpression des paralogues de SUMO a identifié 232 substrats dans des cellules HeLa. Là encore, on observe à la fois des substrats spécifiques de l'un ou l'autre paralogue, ainsi que des substrats non-spécifiques (figure 5) (Becker et al., 2013).



**Figure 5 Analyse protéomique des substrats de SUMO** révélant une relative spécificité de substrats selon les paralogues de SUMO. Les barres gris clair représentent l'abondance relative de peptides associés à SUMO1 par rapport au total des peptides détectés pour le substrat candidat, les barres gris foncé l'abondance relative de peptides associés à SUMO2/3, et les barres noires correspondent au bruit de fond .

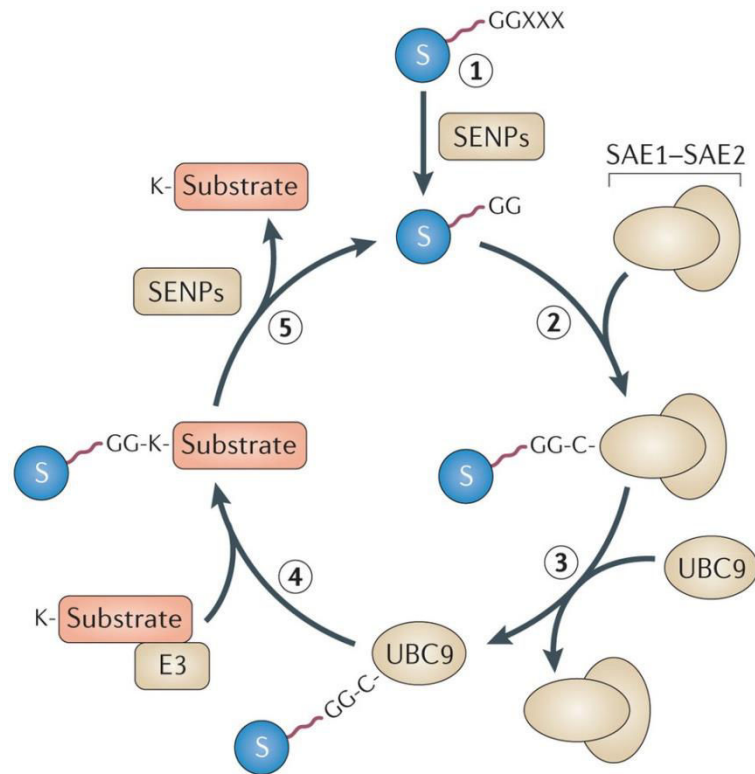
Malgré cette apparente spécificité dans la conjugaison des paralogues, il est intéressant de noter que deux groupes différents ont montré que des souris génétiquement invalidées pour *Sumo1* étaient parfaitement viables et présentaient un développement embryonnaire normal (Evdokimov et al., 2008; Zhang et al., 2008). Ceci indique que SUMO2/3 est capable de compenser la perte de SUMO1. La réciproque n'a pas été testée à ce jour mais il est probable que l'invalidation des gènes *Sumo2* et *Sumo3* ait un fort impact sur le fonctionnement de la cellule, étant donné la non-capacité de SUMO1 à former des chaînes polySUMO. Enfin, la dynamique de conjugaison semble être différente entre les paralogues. Ainsi, SUMO1 paraît lié de manière relativement stable à ses substrats, avec peu de SUMO1 libre disponible. A l'inverse, les formes libres de SUMO2/3 semblent être abondantes et se conjuguent

rapidement aux substrats suite à un stress tel qu'un choc thermique (Saitoh and Hinchey, 2000; Seeler and Dejean, 2003).

Enfin, le rôle du quatrième paralogue de SUMO chez l'Homme, SUMO4, est controversé. Ainsi, sa capacité à être clivé en forme mature et donc sa capacité à être conjugué, son profil d'expression dans l'organisme et son implication dans le diabète de type I sont autant de sujets de désaccords entre différentes études (Chen et al., 2014; Guo et al., 2004; Owerbach et al., 2005).

### **C. Mécanisme de modification par SUMO**

Le processus enzymatique menant à la modification dynamique et réversible d'une protéine par SUMO est similaire à l'ubiquitination. On retrouve ainsi les étapes de maturation, activation, conjugaison, ligation et clivage (figure 6). Cependant, on observe une stricte spécificité concernant les enzymes impliquées dans ces réactions. L'absence de redondance entre les enzymes de la voie de SUMOylation et celles des autres UBL permet l'étude spécifique de celle-ci.



**Figure 6 La cascade de SUMOylation.** Le précurseur de SUMO est dans un premier temps clivé en C-terminal pour exposer le motif di-Glycine (étape 1). SUMO est activé par l'enzyme E1 constituée des sous-unités SAE1 et SAE2 (2), puis transféré à l'enzyme E2 de conjugaison UBC9 (3). L'enzyme E3 permet le rapprochement d'UBC9 avec la protéine substrat, facilitant sa modification covalente par SUMO (4). La réaction est réversible par l'intervention de SUMO protéases ou désSUMOylases (5) (Everett et al., 2013).

### a. Apport de SUMO libre

La synthèse de nouveaux peptides SUMO aboutit à des précurseurs immatures dont le motif di-Glycine en C-terminal est suivi par une séquence de 2 à 11 acides aminés (Gareau and Lima, 2010). Cette séquence doit être clivée pour aboutir à des peptides SUMO mature, terminant par le motif di-Glycine qui leur permettra d'entrer dans le cycle de SUMOylation. Cette maturation a lieu grâce à des enzymes présentant une activité endopeptidase, et qui sont spécifiques de SUMO. Une autre source de SUMO provient du recyclage des SUMO clivés de leur substrat par des enzymes à activité isopeptidases (Hickey et al., 2012).

Chez la levure, on dénombre deux protéases capables de maturer Smt3p et de cliver sa liaison isopeptidique avec le substrat. Il s'agit d'Ulp1 et Ulp2 (Ubiquitin Like Protein 1 et 2).



Chez les Mammifères, trois classes de désSUMOylases ont été décrites à ce jour, selon leur structure : les SENP (Sentrin Protease, en référence à l'ancien nom de SUMO), DESI1 et 2 (Desumoylating Isopeptidase 1 et 2), et USPL1.

Les SENP sont les désSUMOylases les mieux décrites. Elles ont été découvertes au début des années 2000 par homologie de séquences avec Ulp1 (Gong et al., 2000). Il existe six SENP : SENP1, -2, -3, -5, -6, et -7. Leur spécificité de substrat est en grande partie due à leur localisation dans la cellule. Elles se concentrent principalement dans des structures bien différenciées du noyau (table 2). Elles peuvent cliver SUMO1 et SUMO2/3, bien que certaines SENP montrent une affinité supérieure pour l'un ou l'autre paralogue. De même, seulement SENP1, -2 et -5 ont été décrites comme capables de cliver les précurseurs de SUMO, et SENP6 et -7 sont les seules à pouvoir éditer les chaînes de SUMO, c'est-à-dire cliver les liens entre deux SUMO sans ôter le SUMO lié directement au substrat.

DESI1 a été identifiée lors d'un crible à la recherche des partenaires du répresseur transcriptionnel BZEL (BTB-ZF protein expressed in effector Lymphocytes). Sa localisation est diffuse dans le noyau et le cytoplasme, et elle ne partage pas de substrats connus des SENP. Son seul substrat identifié à ce jour est BZEL. Elle partage avec DESI2 la classe structurale des désSUMOylases PPPDE (Permuted Papain fold Peptidases of Double-stranded RNA viruses and Eucaryotes) (Shin et al., 2012).

La troisième classe de désSUMOylases ne comporte qu'un seul membre, USPL1 (Ubiquitin Specific Protease Like 1). Elle est localisée dans des structures nucléaires appelés corps de Cajal. Aucun substrat n'a encore été décrit, mais son rôle est important pour la prolifération cellulaire, la synthèse des snRNA (small nuclear RNA) et l'épissage des ARN pré-messagers (Hutten et al., 2014; Schulz et al., 2012).

**Table 2 Propriétés des désSUMOylases.**

DésSUMOylase	Localisation	Préférence de paralogue	Activité endopeptidase	Activité isopeptidase	Edition des chaînes
<b>SENP1</b>	Pore nucléaire, foci nucléaires	SUMO1 et SUMO2/3	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	Non
<b>SENP2</b>	Pore nucléaire, foci nucléaires, cytoplasme	SUMO2/3 > SUMO1	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	Non
<b>SENP3</b>	Nucléole	SUMO2/3	Inconnu	<b>Oui</b>	Non
<b>SENP5</b>	Nucléole et mitochondrie	SUMO2/3	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>	Non
<b>SENP6</b>	Nucléoplasme	SUMO2/3	Non	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
<b>SENP7</b>	Nucléoplasme	SUMO2/3	Non	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>

<b>DESI1</b>	Cytoplasme et noyau	SUMO1 et SUMO2/3	Faible activité	<b>Oui</b>	Faible activité
<b>DESI2</b>	Cytoplasme	Inconnu	Non	Inconnu	Inconnu
<b>USPL1</b>	Corps de Cajal	SUMO2/3 > SUMO1	Faible activité	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>

### **b. Activation par l'enzyme E1**

Après maturation, le peptide SUMO est activé par la formation d'une liaison thioester entre le résidu Glycine C-terminal et la Cystéine catalytique de l'enzyme E1.

L'enzyme E1 de SUMOylation est unique mais, contrairement à celle de l'ubiquitine qui est un monomère, elle est composée d'un dimère, les deux parties duquel se partagent les domaines essentiels à l'activation de SUMO (Desterro et al., 1999). Les deux membres du dimère sont SAE1 et SAE2 (SUMO Activating Enzyme 1 et 2). SAE1 porte un domaine important pour l'adénylation ATP-dépendante de la Glycine C-terminale de SUMO, tandis que SAE2 porte la Cystéine catalytique avec laquelle SUMO va former une liaison thioester de haute énergie, libérant l'AMP (Tang et al., 2008).

### **c. Conjugaison par l'enzyme E2**

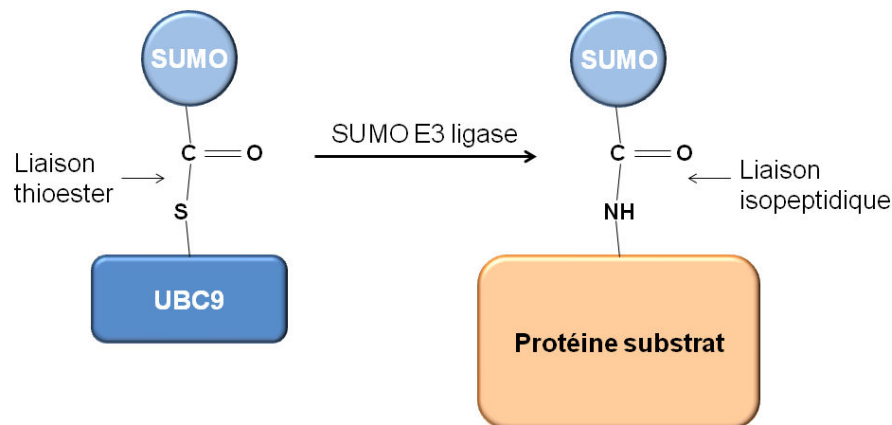
La seconde étape implique le transfert de SUMO de la Cystéine catalytique de SAE2 à la Cystéine catalytique d'UBC9 par trans-thioestérification, sans consommation d'ATP. La protéine UBC9 est l'unique enzyme E2 de SUMOylation. Elle est localisée dans le noyau, dans le cytoplasme, et se concentre au niveau du complexe du pore nucléaire (Lee et al., 1998). Elle est très bien conservée chez tous les eucaryotes, ainsi on retrouve 56% d'identité entre les orthologues de *S. cerevisiae* et de l'Homme, et UBC9 d'origine humaine est capable de compenser la perte d'UBC9 chez la levure (Kovalenko et al., 1996). Cette conservation souligne encore une fois l'importance de la sumoylation chez les eucaryotes. Son extension N-terminale permet l'interaction avec SUMO1 et SUMO2/3, à affinité égale (Tatham et al., 2003).

Contrairement aux enzymes E2 d'ubiquitination, UBC9 est capable d'interagir avec certaines protéines substrats et de les modifier sans l'intervention d'une enzyme E3. Ceci signifie que toute l'information nécessaire à sa sumoylation est intégrée au substrat.

Néanmoins, l'efficacité de la réaction est grandement facilitée par les enzymes E3 ligases, qui apportent également une certaine spécificité de substrat.

#### d. Ligation de SUMO par les enzymes E3 ligases

L'étape finale consiste en la formation d'une liaison covalente de type isopeptidique entre la Glycine C-terminale de SUMO et la Lysine acceptrice du substrat (figure 7).



**Figure 7 Ligation de SUMO.** L'enzyme E3 ligase facilite le transfert de SUMO depuis UBC9 jusqu'à la protéine substrat, avec formation d'une liaison isopeptidique.

La SUMOylation se distingue à nouveau de l'ubiquitination en ce fait que les E3 ligases ne forment pas d'intermédiaire covalent avec le peptide modificateur, comme c'est le cas pour les E3 de type HECT ou les RBR. De plus, les E3 de SUMOylation sont capables de s'autoSUMOyler. Si plusieurs centaines d'E3 sont caractérisées pour l'ubiquitine, on en dénombre beaucoup moins pour SUMO. Elles peuvent néanmoins être classées en plusieurs familles, détaillées ci-dessous.

La famille ayant le plus de représentants est celle des E3 ligases à domaine SP-RING (Siz/PIAS-RING). Ces enzymes présentent un domaine RING similaire au domaine RING de certaines ubiquitine E3 ligases, et qui est indispensable à leur fonction ligase. Elles sont capables de lier la protéine cible et UBC9 directement ainsi que SUMO *via* un motif SIM (SUMO Interacting Motif). Cette famille regroupe les protéines PIAS (Protein Inhibitor of

Activated Signal Transducers and Activators of Transcription(STAT)). Elles sont encodées par quatre gènes chez l'Homme et la souris (*Pias1*, -2, -3 et -4, ce dernier plus communément nommé *Piasy*) codant pour plusieurs isoformes. Les protéines de la famille PIAS contiennent plusieurs domaines conservés d'une isoforme à l'autre : on trouve notamment un domaine SAP (Scaffold-attachment factor A, Acinus and PIAS) permettant la liaison à l'ADN, le domaine SP-RING important pour la SUMOylation ainsi qu'un SIM, permettant l'interaction avec SUMO (Rytinki et al., 2009).

Les souris invalidées pour *Pias1* sont néanmoins plus résistantes aux infections virales, grâce à une augmentation de la production d'interféron beta (IFN $\beta$ ) et gamma (IFN $\gamma$ ) (Liu et al., 2004). Les auteurs attribuent ce phénotype à la levée de l'inhibition de STAT1 exercée par PIAS1. Les souris invalidées pour *Pias2* présentent des anomalies de la lignée germinale n'affectant pas leur fertilité (Santti et al., 2005). Enfin, les souris invalidées pour *Piasy* ont un léger défaut dans la voie de signalisation de l'IFN $\gamma$  et WNT. De plus, notre laboratoire a montré que la sénescence cellulaire des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) *Piasy*<sup>-/-</sup> était fortement retardée par rapport à celle de MEFs contrôles (Bischof et al., 2006).

Ces phénotypes modérés suggèrent que les protéines codées par les gènes *Pias* partagent des fonctions redondantes, dans la mesure où aucune des souris invalidées pour *Pias1*, *Pias2* ou *Piasy* ne montre un phénotype létal, et la sumoylation globale ne semble pas altérée par l'un ou l'autre de ces génotypes. Il faut néanmoins souligner qu'aucune souris *Pias3*<sup>-/-</sup> n'a été créée à ce jour, et que la double invalidation *Pias1*<sup>-/-</sup> et *Piasy*<sup>-/-</sup> cause une mortalité embryonnaire avant 11,5 jours de développement (Tahk et al., 2007).

Les SUMO E3 ligases à domaine SP-RING comportent également la protéine de levure MMS21 (Methyl Methane Sulfonate sensitivity 21). Elle fait partie du complexe SMC5-SMC6 essentiel dans la réparation de l'ADN, ainsi que pour la maintenance des télomères. Enfin, la protéine de levure Zip3 impliquée dans la méiose représente le troisième membre de cette famille.

La seconde famille de SUMO E3 ligases est représentée par la protéine RanBP2 (ou NUP358 pour Nucleoporin 358). Elle est présente au pore nucléaire dans les cellules en interphase, et au niveau des kinétochores et du fuseau mitotique dans les cellules en mitose. Cette localisation se retrouve dans ses fonctions : elle est essentielle au transport nucléocytoplasmique et son activité E3 ligase est requise pour la ségrégation chromosomique en mitose (Hamada et al., 2011). Seulement quelques substrats ont été identifiés *in vivo*,

notamment la Topoisomérase II et la Boréoline (Dawlaty et al., 2008; Klein et al., 2009). Au pore nucléaire, RanBP2 fait partie d'un complexe avec RanGAP1, SUMO1 et UBC9. De manière surprenante cependant, RanBP2 n'est pas l'E3 ligase de RanGAP1. Sa présence est requise pour protéger le complexe de l'intervention des déSUMOylases. Elle explique également la spécificité de paralogie observée pour RanGAP1. En effet, si RanGAP1 peut être SUMOylée indifféremment par SUMO1 ou SUMO2/3 *in vitro*, *in vivo* on ne retrouve que la forme RanGAP1\*SUMO1. Ceci est dû au fait que SUMO2/3 interagit moins fortement avec RanBP2 dans le contexte de ce complexe, et laisse ainsi l'accès aux déSUMOylases (Zhu et al., 2009). Ce complexe entier (RanBP/RanGAP1\*SUMO1/UBC9) servirait alors d'E3 ligase pour les substrats qui traversent le pore nucléaire (Flotho and Werner, 2012).

La protéine Polycomb2 (Pc2) aussi nommée CBX4 (Chromobox protein homolog 4) présente également une activité SUMO E3 ligase. Elle a été initialement découverte comme membre des PcG (Polycomb Group protein), formant d'importants complexes multimériques impliqués dans la méthylation des histones, réprimant la transcription, ce qui est un mécanisme épigénétique clé pour la différenciation des cellules. Sa localisation est restreinte à des structures nucléaires appelées corps PcG, généralement associés à l'hétérochromatine péricentromérique.

Parmi les autres E3 ligases, citons les HDAC (Histone DeAcetylases), qui pour certaines sont capables de SUMOyler des substrats tels que MEF2 et HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1), ou encore PML (ProMyelocytic Leukemia protein) (Gao et al., 2008; Grégoire and Yang, 2005; Kirsh et al., 2002; Yang and Grégoire, 2006; Zhao et al., 2005). On trouve également TOPORS (Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich, E3 ubiquitin ligase) qui a la particularité de posséder une activité ubiquitine- et SUMO-ligase. Ses substrats sont pour l'instant limités au suppresseur de tumeur p53 et à mSin3A (Pungaliya et al., 2007).

Enfin la protéine PML et les protéines de la famille TRIM possèdent un domaine RING avec un motif TRIM/RBCC. PML est une des protéines les plus SUMOylées de la cellule, et Chu *et al.* ont observé une activité E3 ligase de PML et d'autres TRIM permettant la SUMOylation de p53 et MDM2 (Chu and Yang, 2011). S'il s'avérait que le motif TRIM est un nouveau domaine à activité SUMO E3 ligase, la famille des protéines TRIM constituerait une nouvelle grande classe de ligases. De plus, il est intéressant de noter que les protéines de la famille TRIM présentent un lien important avec la réponse antivirale. En effet, la plupart de ces protéines sont induites par les interférons de type I et II et exercent un rôle de restriction

antivirale, à travers plusieurs mécanismes différents, dont l'ubiquitination (Rajsbaum et al., 2014).

## **e. Séquences régulatrices de la SUMOylation**

### **1) Conjugaison de SUMO sur des motifs consensus**

La conjugaison de SUMO a majoritairement lieu sur des lysines comprises dans un site consensus. La séquence la plus simple et la plus répandue formant le motif consensus  $\psi$ -K-x-[D/E], dans laquelle  $\psi$  est un acide aminé hydrophobe (Leucine, Valine, Isoleucine ou Alanine), K est une Lysine, x est n'importe quel acide aminé et D/E sont soit un acide Aspartique soit un acide Glutamique (Johnson and Blobel, 1999). L'ajout artificiel de ce motif sur une protéine suffit à induire sa SUMOylation *in vitro*, tandis qu'*in vivo* un signal d'importation nucléaire est nécessaire en plus (Rodriguez et al., 2001). Cette séquence consensus interagit directement avec UBC9, ce qui explique qu'au moins *in vitro*, la SUMOylation est possible sans l'intervention d'une E3 ligase (Sampson et al., 2001). La résolution de la structure de plusieurs complexes UBC9/substrat a permis de montrer que la séquence consensus adopte une conformation étendue permettant à la Lysine cible de se nicher dans une poche hydrophobe d'UBC9. Cette conformation étendue implique une contrainte supplémentaire sur la cible de SUMOylation. Ainsi un nombre important de sites de SUMOylation se trouvent dans des boucles étendues ou des régions non-structurées des protéines cibles (Gareau and Lima, 2010). C'est notamment le cas de SUMO2/3, dans lesquels le site de SUMOylation se situe dans l'extension N-terminale du peptide (figure 8).

### **2) Dérivés du motif consensus**

Des motifs plus étendus ont également été décrits. Il existe par exemple des motifs de SUMOylation phospho-dépendants (PDSM : Phospho Dependant SUMOylation Motif). Ce motif apparaît dans des substrats de kinases Proline-dépendantes (Yang and Grégoire, 2006) et suit le schéma  $\psi$ xK(D/E)xxSP où S est une Sérine phosphorylable et P une Proline. La chaîne latérale de la Sérine phosphorylée interagit également avec UBC9 et augmente fortement son affinité pour la protéine cible. Ce mécanisme de SUMOylation phospho-dépendante est impliqué dans la régulation de la transcription, en modifiant l'activité de facteurs de transcription, d'activateurs à répresseurs. C'est le cas notamment de

PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ) ou MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (Hietakangas et al., 2006).

L'augmentation de l'affinité d'UBC9 pour les substrats est observée de manière similaire par le biais d'un résidu chargé négativement en C-terminal du consensus.

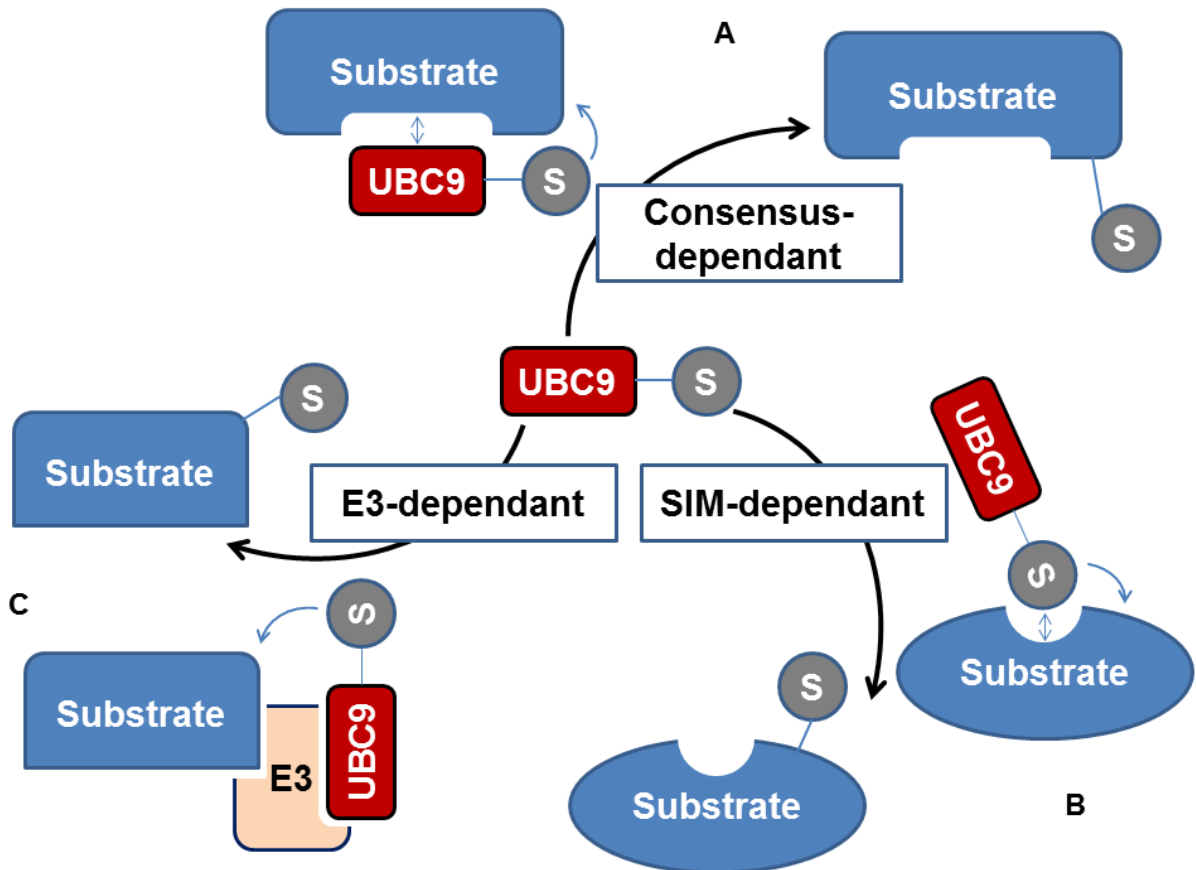
Une étude protéomique des substrats de SUMO2 a montré que plus de la moitié des substrats sont SUMOylés au niveau d'une Lysine située dans un motif consensus. Un quart des autres Lysines cibles sont dans un site consensus légèrement modifié, tel que le PDSM, ou encore un site consensus inversé. Environ 10% seulement des substrats sont SUMOylés dans un site très différent du consensus (Matic et al., 2010) (figure 8).

### **3) SUMOylation SIM-dépendante**

La SUMOylation en dehors des Lysines consensus est rendue possible par la présence d'un SIM (SUMO Interacting Motif), permettant une interaction non-covalente avec le SUMO chargé sur UBC9. Le SIM est un motif constitué d'un corps hydrophobe flanqué par des résidus sérines potentiellement phosphorylés et/ou des résidus acides. L'augmentation des charges négatives autour du corps hydrophobe augmente la force d'interaction entre SUMO et le SIM (Flotho and Melchior, 2013; Lin et al., 2006). Les cibles de SUMOylation qui sont dépendantes d'un SIM peuvent être SUMOylées sur n'importe quelle Lysine, et la mutation d'une des Lysines n'affecte pas le potentiel de SUMOylation de la protéine cible. A titre d'exemple de tels substrats, citons les protéines Daxx (Death domain associated protein), BLM (Bloom syndrome RecQ helicase-like protein) ou USP25 (Ubiquitin-Specific Protease 25) (Chang et al., 2011a; Meulmeester et al., 2008; Zhu et al., 2008) (figure 8).

### **4) SUMOylation dépendante d'une E3-ligase**

*In vitro*, la SUMOylation est possible en absence d'une E3 ligase grâce à la capacité d'UBC9~SUMO d'interagir avec de nombreux substrats. Dans certains cas cependant, les Lysines cibles restent inaccessibles à l'E2, et une E3 est strictement nécessaire, *in vitro* et *in vivo*. C'est le cas par exemple de la protéine de levure PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Pfander et al., 2005) (figure 8).



**Figure 8** Spécificités d'interaction déterminant les sites de SUMOylation. La reconnaissance du substrat par la machinerie de SUMOylation peut faire intervenir une séquence consensus du substrat (A), un SIM présent dans le substrat (B), ou reposer majoritairement sur l'interaction avec une E3 ligase (C).

#### D. Régulation de la SUMOylation

La SUMOylation est un processus dynamique et beaucoup d'efforts ont été apportés pour déterminer les mécanismes régulant la SUMOylation/désSUMOylation d'un substrat donné, ou de nombreux substrats. Ainsi, il a été montré que certains substrats précis peuvent être SUMOylés/désSUMOylés de façon ponctuelle suite à un stimulus, mais aussi que la SUMOylation peut s'appliquer à un groupe de protéines, et que l'impact fonctionnel de SUMO sur ce groupe est conservé quel que soit la protéine SUMOylée au sein du complexe. Enfin, certains stress peuvent induire une SUMOylation ou une désSUMOylation globale sans spécificité de substrats. Ceci indique une grande ouverture dans le nombre de mécanismes dans lesquels SUMO est impliqué, et révèle une complexité encore accrue par rapport à celle préexistante et liée au nombre de substrats.



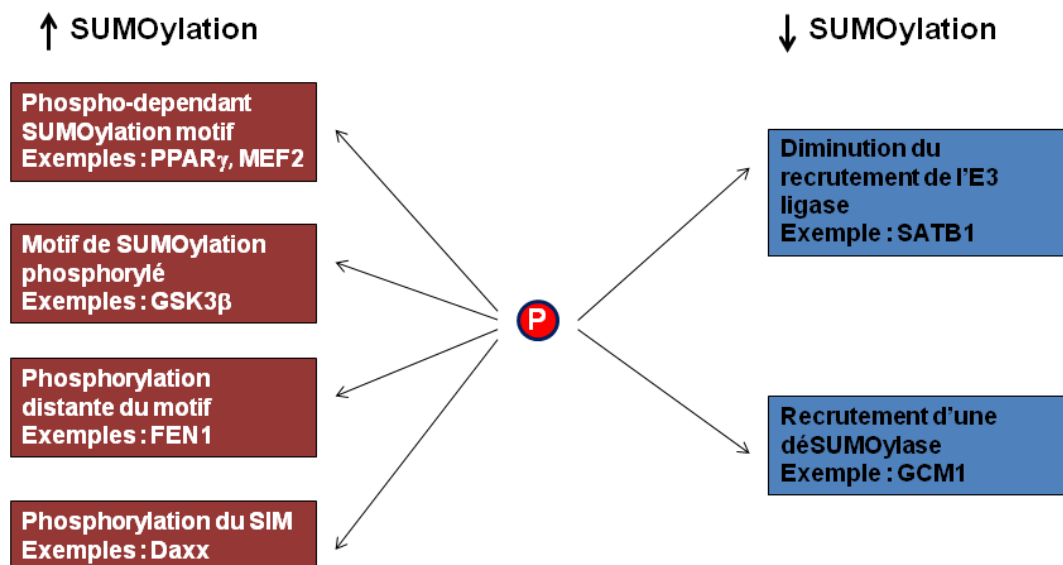
## a) Régulation de la SUMOylation par d'autres modifications post-traductionnelles

### 1) Phosphorylation

Comme nous l'avons vu précédemment avec le motif PDSM, la phosphorylation d'un substrat peut réguler la SUMOylation de manière positive en renforçant l'interaction entre UBC9 et le substrat. Une étude récente par Picard *et al.* a introduit une variation du motif PDSM. Dans ce nouveau motif découvert sur le récepteur aux œstrogènes  $\beta$  (ER $\beta$ ), le consensus est imparfait puisque le résidu acide qui termine le motif, généralement glutamate ou aspartate, est remplacé par une sérine, ce qui empêche l'interaction avec UBC9. Cependant, cette sérine peut être phosphorylée par la kinase GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), créant une charge négative en position 4 du motif, et permettant ainsi l'interaction avec UBC9 et la SUMOylation de la Lysine (Picard et al., 2012). Ce motif a été nommé pSuM (phosphorylated Sumoylation Motif), ou motif de SUMOylation phosphorylé. Un autre mécanisme de SUMOylation phosphorylation-dépendante a été décrit pour la protéine FEN1 (flap endonucléase 1). Dans ce cas précis, la phosphorylation a lieu à une relativement grande distance du site de SUMOylation (19 acides aminés), mais favorise néanmoins la modification par SUMO. Il reste à déterminer si cette phosphorylation augmente directement l'interaction avec UBC9 ou si le mécanisme requiert l'intervention d'une E3 ou d'une protéine chaperonne par exemple (Guo et al., 2012). Un dernier mécanisme dans lequel la SUMOylation découle d'une phosphorylation préalable a été décrit pour la protéine Daxx. Daxx interagit avec UBC9 chargé par le biais d'un SIM, et cela permet la modification par SUMO au niveau de plusieurs lysines acceptrices. Ce SIM contient une sérine qui peut être phosphorylée, et ceci favorise l'interaction avec UBC9 chargé, et augmente la SUMOylation de Daxx (Chang et al., 2011a).

Il est important de noter que la phosphorylation n'entraîne pas systématiquement une augmentation de la SUMOylation. En effet, ces deux modifications peuvent également entrer en compétition. Deux mécanismes ont été décrits pour expliquer cette compétition. Le premier concerne la protéine SATB1 (Special AT rich sequence Binding protein 1). La phosphorylation de SATB1 empêche l'interaction et le recrutement de la SUMO E3 ligase PIAS1, et inhibe ainsi sa propre SUMOylation (Tan et al., 2010). Le second concerne GCM1 (Glial Cell Missing 1). Dans ce cas, la phosphorylation augmente le recrutement d'une désSUMOylase, SENP1, et diminue ainsi la fraction SUMOylée (Chang et al., 2011b).

Il existe donc une multitude de mécanismes par lesquels la phosphorylation influence la SUMOylation (figure 9)



**Figure 9 Influence de la phosphorylation d'un substrat sur sa SUMOylation.** La phosphorylation influence la SUMOylation d'un substrat, soit en l'augmentant (à gauche), en modifiant des séquences consensus, des résidus distants du motif consensus ou encore un SIM, soit en la diminuant (à droite), en modifiant les interactions avec des E3 ligase ou une déSUMOylase.

## 2) Acétylation

L'acétylation d'une protéine intervenant *via* ses résidus lysines, comme la SUMOylation, ces deux modifications peuvent entrer en compétition, comme cela a été montré pour la protéine suppresseur de tumeur HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) (Stankovic-Valentin et al., 2007). Fonctionnellement, ceci contrôle la fonction de HIC1 et la fait passer d'un état permissif pour la transcription (acétylé) à non-permissif (SUMOylé) (Dehennaut et al., 2013).

De plus, il a été montré par Wu *et al.* que la SUMOylation de p53 sur la lysine 386 diminue son acétylation sur des lysines adjacentes K373 et K382. En revanche, l'inverse n'est pas vrai, et p53 acétylé peut tout aussi bien être SUMOylé que p53 libre (Wu and Chiang, 2009).

Enfin, l'acétylation de SUMO lui-même empêche son interaction avec un SIM. Un tel mécanisme a été montré pour la régulation de la liaison de SUMO avec les SIMs de Daxx, PML et différentes PIAS. L'acétylation de la lysine 37 de SUMO1 ou 33 de SUMO2/3 est

retrouvée de manière physiologique, comme l'ont montré les travaux du laboratoire de S. Müller (Cheema et al., 2010; Ullmann et al., 2012).

### **3) Ubiquitination**

L'ubiquitination étant une modification post-traductionnelle ciblant les lysines, une compétition est observée avec la SUMOylation pour la modification d'une même lysine. Ainsi, il a été montré que la SUMOylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor of kappa-b alpha) empêche son ubiquitination. L'ubiquitination d'I $\kappa$ B $\alpha$  conduit à sa dégradation par le protéasome, permettant l'activation de la voie en libérant le facteur de transcription NF $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B). Ainsi la compétition exercée par SUMO sur cette lysine permet la stabilisation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et tempère l'activation de la voie (Desterro et al., 1998).

De même pour PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), une compétition entre l'ubiquitination et la SUMOylation de la lysine 164 permet une fine régulation de la réparation de l'ADN liée à la réplication. PCNA est une protéine appartenant à la famille des clamps glissants. C'est un homotrimère qui encercle l'ADN durant la réplication, en phase S, et sert de plateforme pour guider les ADN polymérases et les différents facteurs liés à la réplication. Si une cassure intervient durant la réplication de l'ADN, celle-ci est mise en pause, et cela conduit à l'ubiquitination de PCNA. Si PCNA est monoubiquitiné sur la lysine 164, la réplication continue malgré la cassure, ce qui peut causer des erreurs. Ce phénomène est appelé TLS pour « translesion synthesis ». Si la TLS échoue, PCNA devient polyubiquitiné (avec des branchements en K63), et un mécanisme de réplication sans erreur, par recombinaison homologue, intervient. La SUMOylation de PCNA intervient également au cours de la réplication, et chasse la recombinaison Rad51 de l'ADN, ce qui empêche toute recombinaison non souhaitée (Bergink and Jentsch, 2009).

Enfin, une récente étude protéomique par Tammsalu *et al.* a permis d'observer que 37,8% des sites de SUMOylation caractérisés étaient également potentiellement modifiables par l'ubiquitine, ce qui suggère qu'une compétition entre l'ubiquitine et SUMO est un mécanisme relativement répandu (Tammsalu et al., 2014).

#### **b) Régulation par changement conformationnel**

Certains récepteurs peuvent être SUMOylés, et leur SUMOylation est dépendant de l'interaction avec leur ligand. Le premier récepteur SUMOylé découvert fut le récepteur aux

androgènes AHR, modifié par SUMO1 (Poukka et al., 2000). Les récepteurs PPAR $\gamma$  et les LXR (Liver X Receptor) sont également SUMOylés suite à l'engagement par leur ligand (Ghisletti et al., 2007; Pascual et al., 2005).

### c) Régulation globale par un stress

La SUMOylation peut également être régulée à l'échelle de la cellule entière. Ainsi, plusieurs stimuli associés à des stress peuvent diminuer la concentration globale de substrats SUMOylés ou l'augmenter. Cette régulation met principalement en jeu la polySUMOylation de substrats par SUMO2/3, les deux paralogues pour lesquels la concentration de SUMO libre et disponible est élevée (Saitoh and Hinchey, 2000).

Il est par exemple bien établi qu'un choc thermique entraîne une augmentation globale de la SUMOylation. Cette hyperSUMOylation est essentielle pour une réponse adéquate à ce stress physique, comme l'ont démontré Golebiowski *et al.* en induisant un choc thermique dans des cellules HeLa déficientes pour SUMO2. Les cellules déficientes pour SUMO2 présentent une mortalité accrue suite au choc thermique par rapport aux cellules contrôle. De plus, une étude protéomique des substrats hyperSUMOylés lors d'un choc thermique montre qu'une grande partie d'entre eux sont impliqués dans la réponse au stress (Golebiowski et al., 2009). Des études récentes semblent indiquer que cette hyperSUMOylation serait due en partie au fait que les SENP sont des protéines thermosensibles qui sont rapidement dégradées pendant le choc thermique. La balance dynamique de conjugaison/déconjugaison serait donc déséquilibrée et mènerait à une hyperSUMOylation globale (Pinto et al., 2012). Cette explication ne paraît néanmoins pas satisfaisante pour expliquer l'enrichissement des substrats hyperSUMOylés pour des protéines de réponse au stress. Si toutefois elle était avérée, cela signifierait que les protéines de réponse au stress sont celles pour lesquelles le cycle de SUMOylation/désSUMOylation est le plus dynamique. Une autre étude suggère que SUMO marquerait les protéines mal repliées produites au cours du choc (Castorálová et al., 2012).

Concernant le stress oxydant, deux phénotypes opposés sont observés. Le traitement de cellules avec de fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100mM) conduit à une hyperSUMOylation massive, probablement par inactivation des désSUMOylases. En revanche, à des concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reflétant un stress oxydant physiologique (jusqu'à 1mM), une rapide désSUMOylation globale a été observée. Cette désSUMOylation est causée par la

formation d'un pont disulfure réversible entre les cystéines catalytiques des enzymes E1 et E2 de SUMOylation, inhibant leur fonctionnement (Bossis and Melchior, 2006).

#### **d) Régulation exogène de la SUMOylation**

##### **1) Régulation de la SUMOylation par des drogues**

Etant donné le large spectre d'action de la SUMOylation, et son potentiel rôle dans de nombreuses pathologies, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, quelques tentatives d'inhibition chimique de la SUMOylation ont eu lieu. Cependant à ce jour, aucun inhibiteur ne s'est avéré suffisamment spécifique pour être utilisé comme outil ou comme traitement.

Les premières molécules chimiques décrites comme inhibitrices de la SUMOylation sont l'acide ginkgolique et l'acide anacardique. Elles ont été découvertes à l'occasion d'un crible de substances naturelles altérant la SUMOylation. Le mécanisme d'action de ces deux molécules consiste en l'inhibition de la formation du pont thioester entre l'enzyme E1 et le peptide SUMO (Fukuda et al., 2009a). La même année, un nouveau composé naturel extrait d'un champignon, la kerriamycine B, a été découverte (Fukuda et al., 2009b). Son mécanisme d'action est identique. Leur concentration inhibitrice médiane (IC50) est de l'ordre du micromolaire ou de la dizaine de micromolaire, ce qui en fait des molécules peu puissantes et difficilement utilisables *in vivo*. De plus, aucune donnée sur leur spécificité n'étant disponible, l'utilisation de ces molécules pour étudier la SUMOylation est hasardeuse, tout comme leur potentiel thérapeutique. L'enzyme E1 de SUMOylation est également la cible de molécules synthétiques décrites par Lu *et al.* et par Kumar *et al.*, bien que ces études se soient limitées à des expériences *in vitro*, sans vérifier leur efficacité sur cellules (Lu et al., 2010)(Kumar et al., 2013).

Deux inhibiteurs ciblant l'enzyme E2 UBC9 ont également été découverts. Le premier est une molécule naturelle extraite d'un champignon, la spectomycine B1. Celle-ci empêche la formation du pont thioester entre UBC9 et SUMO1. Elle est efficace *in vitro* et *in vivo* sur

cellules en culture (Hirohama et al., 2013). Le second inhibiteur est une molécule synthétique (2D08), qui agit en inhibant le transfert de SUMO d'UBC9 à son substrat (Kim et al., 2013).

Bien que peu exploitables en l'état, à cause de problèmes de spécificité et de puissance, ces molécules peuvent servir de base à l'élaboration de composés utilisables en laboratoire, voire en thérapie. Elles sont résumées dans la table 3.

Enfin, il est intéressant de noter que plusieurs études ont été menées dans le but de découvrir des inhibiteurs de la SUMO protéase SENP1. En effet, comme nous le détaillerons plus tard, SENP1 est impliquée dans le cancer de la prostate et pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante (Chen et al., 2012; Qiao et al., 2011; Sommer et al., 2013; Uno et al., 2012).

**Table 3 Modulateurs chimiques de la SUMOylation.**

Molécules	Cible	IC50	Efficacité	Référence
Acide ginkgolique	SAE1	3 $\mu$ M	<i>In vitro</i> et sur cellules	(Fukuda et al., 2009a)
Acide anacardique	SAE1	2,2 $\mu$ M	<i>In vitro</i> et sur cellules	(Fukuda et al., 2009a)
Kerriamycine B	SAE1	11,7 $\mu$ M	<i>In vitro</i> et sur cellules	(Fukuda et al., 2009b)
Dérivés de quinazolinyloxy-biaryl-urée	SAE1	>13,4 $\mu$ M	<i>In vitro</i>	(Kumar et al., 2013)
Dérivés « suicides » de SUMO	SAE1	Non déterminée	<i>In vitro</i>	(Lu et al., 2010)
Spectomycine B1	UBC9	4,4 $\mu$ M	<i>In vitro</i> et sur cellules	(Hirohama et al., 2013)
2D08	UBC9	6 $\mu$ M	<i>In vitro</i> et sur cellules	(Kim et al., 2013, 2014)

## 2) Régulation de la SUMOylation par des pathogènes

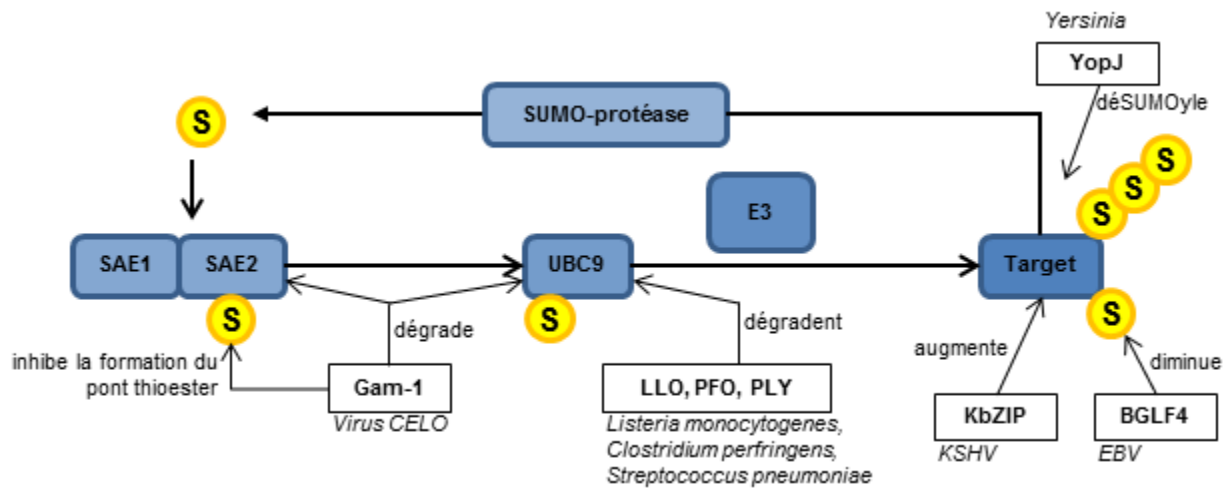
Comme nous le verrons en détail par la suite, la SUMOylation est un acteur majeur dans les mécanismes de défense immunitaire. Par conséquent, certains pathogènes ciblent la SUMOylation pour contourner ces mécanismes. Si un nombre important d'interactions

spécifiques entre la machinerie SUMO et certaines protéines, notamment virales, ont été décrites, seuls quelques exemples de régulation globale de la SUMOylation par des pathogènes sont connus. Le premier exemple est venu de la protéine Gam-1 du virus CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan virus). Celle-ci est capable d'inhiber la SUMOylation par deux mécanismes complémentaires. Le premier consiste à bloquer la formation du pont thioester entre SAE2 et SUMO, empêchant ainsi l'activation des peptides SUMO. Le second mécanisme passe par la dégradation des enzymes E1 et E2 par le système ubiquitine/protéasome (Boggio et al., 2004). Un second exemple de protéine virale capable de diminuer la SUMOylation globale a été proposé récemment. Il s'agit de la protéine BGLF4 du virus EBV (Epstein-Barr Virus). Cependant dans ce cas, le mécanisme d'inhibition reste inconnu à ce jour, mais semble être dépendant du domaine SIM de BGLF4 ainsi que de son activité protéine kinase (Li et al., 2012).

Certaines bactéries peuvent également cibler la SUMOylation globale. C'est le cas des bactéries de la famille *Yersinia* qui utilisent la protéine YopJ, possédant une forte homologie avec des protéases d'Ubiquitin-like, pour provoquer une désSUMOylation massive des cellules infectées (Orth, 2000). Par ailleurs, l'infection de cellules par *Listeria monocytogenes* provoque une vague de désSUMOylation globale, provoquée par la dégradation d'UBC9, par un mécanisme dépendant du facteur de virulence LLO (ListerioLysine O). Cette protéine est une perforine dont on retrouve des homologues chez *Clostridium perfringens* et *Streptococcus pneumoniae*, respectivement PFO et PLY. Celles-ci provoquent de manière similaire une désSUMOylation par dégradation d'UBC9, suggérant que d'autres bactéries sont capables de cibler la SUMOylation (Ribet et al., 2010) (figure 10).

Enfin, et contrairement aux phénotypes précédents, la protéine KbZIP (KSHV basic Leucine Zipper) du virus KSHV (Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus), semble favoriser une hyperSUMOylation globale, et agit comme une E3 ligase pour la protéine p53.

Les opinions divergent concernant l'intérêt d'une telle modulation pour les pathogènes, et il est probable que cet intérêt soit pathogène-spécifique et dépendant du mode de virulence de celui-ci. De plus, les travaux décrits dans ce manuscrit permettront d'éclairer un peu plus le rôle de la SUMOylation dans la réponse immunitaire.



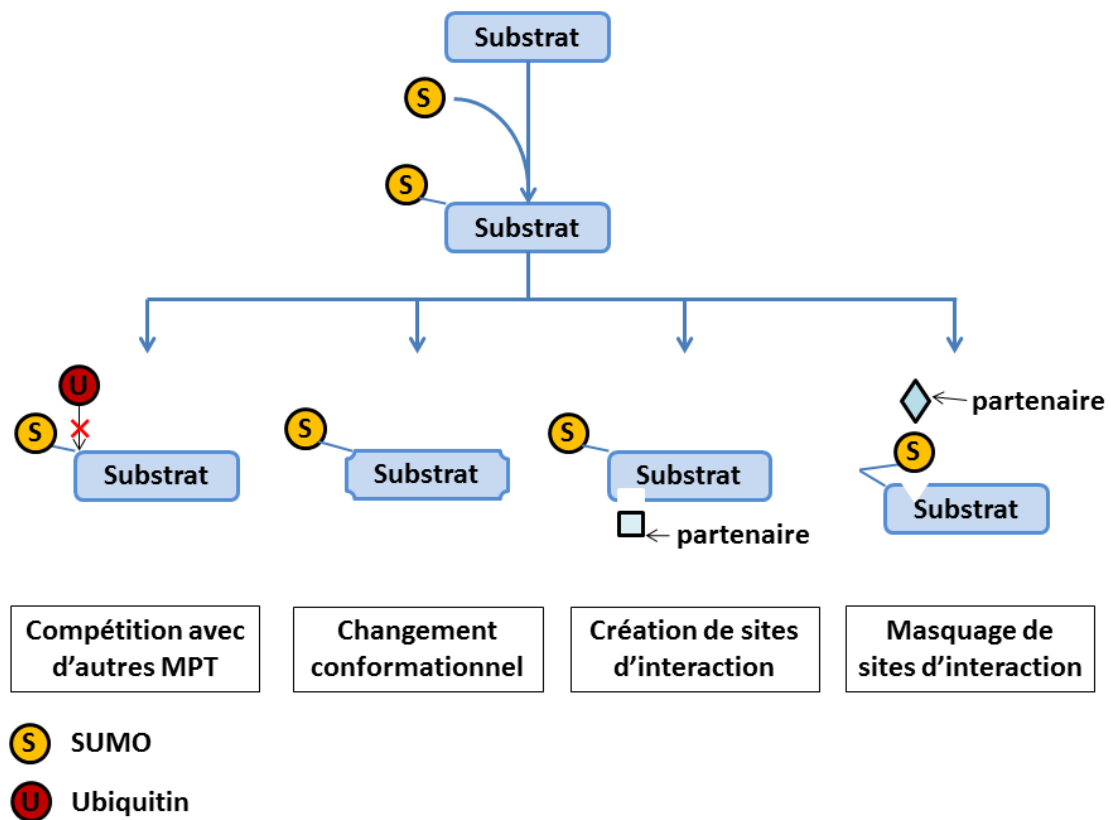
**Figure 10 Contrôle de la SUMOylation par des pathogènes.** Les protéines de pathogènes Gam-1, LLO, PFO, PLY, KbZIP, BGLF4 et YopJ régulent la SUMOylation globale des cellules infectées, par des mécanismes ciblant différentes étapes du cycle.

La SUMOylation est donc une modification post-traductionnelle soumise à une régulation importante, et son niveau global ou substrat-spécifique peuvent être influencés par des modifications physiologiques, des drogues et des pathogènes.

## E. Conséquences de la SUMOylation sur les protéines

La SUMOylation a de multiples conséquences sur la protéine substrat. Elle peut changer sa stabilité, sa localisation, ou influencer son activité. Ces changements sont le reflet de quatre types de changements au niveau moléculaire : (i) Comme vu précédemment, SUMO peut entrer en compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles, modifiant l'équilibre entre les différentes formes modifiées de la protéine cible. (ii) SUMO peut également masquer un site d'interaction avec un partenaire de la protéine cible. (iii) Au contraire, SUMO peut créer un site d'interaction avec un nouveau partenaire. (iv) Enfin, SUMO peut modifier la conformation de la protéine cible. Nous aurons l'occasion de voir par la suite des exemples de chacun de ces types de changements et leurs conséquences pour la protéine modifiée (Figure 11).





**Figure 11 Conséquences moléculaires de la modification par SUMO.** De gauche à droite : la SUMOylation peut entrer en compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles (MPT), modifier la conformation du substrat, créer un ou plusieurs sites d'interaction du substrat avec d'autres partenaires, ou enfin masquer des sites d'interaction avec des partenaires.

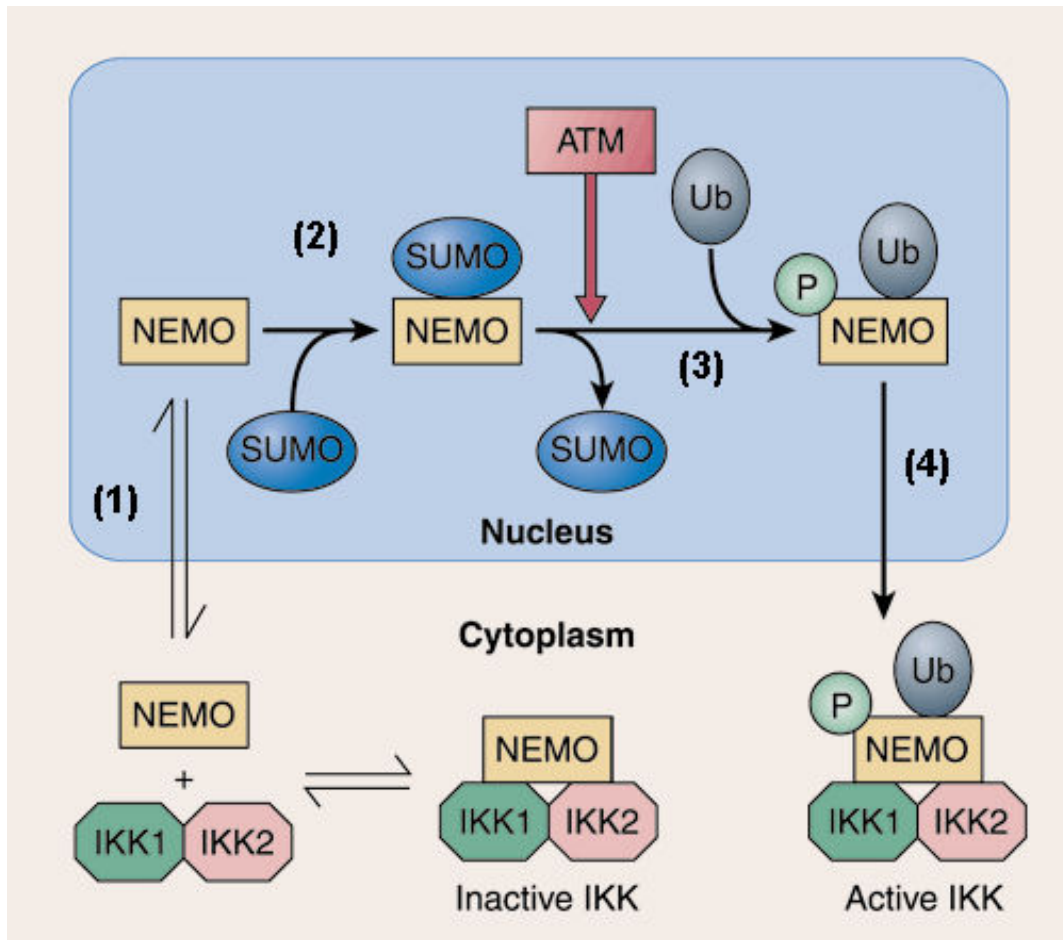
Le nombre de substrats de SUMOylation décrits croît à chaque nouvelle étude protéomique. Certains substrats tels que PML ou RanGAP1 sont majoritairement SUMOylés, et il est relativement facile de détecter les formes modifiées par des techniques classiques comme l'immuno-détection de protéine après transfert sur membrane (« western blot »). Cependant, pour la plupart des substrats, seule une faible fraction de la protéine totale est SUMOylée. Il peut paraître alors surprenant que la SUMOylation de la protéine parvienne à avoir un impact sur la fonction du substrat.

Ceci implique d'imaginer la protéine modifiée par SUMO comme un intermédiaire réactionnel. Son rôle serait ainsi d'initier une réaction modifiant la fonction de la protéine cible, sans toutefois être nécessaire au maintien de cette fonction.

A titre d'exemple, la protéine NEMO/IKK $\gamma$  (NF- $\kappa$ B Essential MODulator/I $\kappa$ B Kinase gamma) est SUMOylée selon ce modèle. NEMO est un modulateur essentiel de la voie NF- $\kappa$ B. Cette voie est impliquée dans la mise en place d'un programme transcriptionnel

spécifique suite à une activation par l'engagement d'un récepteur transmembranaire (de type TLR – Toll-Like Receptor ou TNFR – Tumor Necrosis Factor Receptor), d'origine exogène, ou par un signal de dommage à l'ADN, donc d'origine intra-cellulaire. L'activation de NEMO entraîne l'activation du complexe trimérique IKK, composé de NEMO/IKK $\gamma$  et de deux kinases, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ . Le complexe IKK phosphoryle alors I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor of kappaB alpha), entraînant sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La fonction d'I $\kappa$ B $\alpha$  étant d'inhiber la voie NF $\kappa$ B en séquestrant le facteur de transcription NF $\kappa$ B dans le cytoplasme, sa dégradation permet la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau et la transcription de ses gènes cibles.

La SUMOylation de NEMO est essentielle à l'activation de cette voie par les dommages à l'ADN. En effet, selon une étude réalisée par Huang *et al.*, le stress provoqué par un dommage à l'ADN induit la SUMOylation de NEMO. Ceci a pour conséquence de maintenir NEMO dans le noyau. NEMO est alors polyubiquitiné dans le noyau, déSUMOylé, puis transporté dans le cytoplasme sous sa forme activée, ou elle interagit avec les autres membres du complexe IKK pour activer la voie en aval. Il est intéressant, dans l'optique de cette thèse, de noter que la SUMOylation de NEMO est donc activatrice de la voie NF- $\kappa$ B. Cependant, l'étude en question a montré que la SUMOylation de NEMO est importante pour son activation dans le cadre du dommage à l'ADN mais n'intervient pas dans la signalisation en aval des récepteurs transmembranaires (Huang et al., 2003) (figure 12).



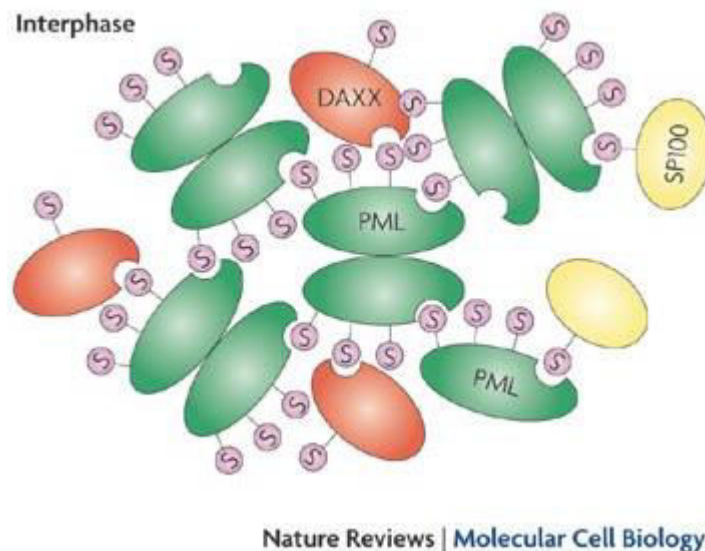
**Figure 12 La SUMOylation transitoire de NEMO est nécessaire à la réponse aux dommages à l'ADN.** Au niveau basal, NEMO est en équilibre entre le cytoplasme et le noyau (1). Suite à un dommage à l'ADN, NEMO est SUMOylé, ce qui cause sa rétention nucléaire (2). La kinase ATM est activée indépendamment, et cause la déSUMOylation de NEMO pour permettre son ubiquitination (3). NEMO est alors exporté dans le cytoplasme où il peut activer le complexe IKK (4) et ainsi le reste de la voie NF- $\kappa$ B (illustration d'après (Hay, 2004)).

Ce mécanisme d'action reposant sur une SUMOylation transitoire illustre bien le rôle critique de la SUMOylation, y compris lorsque celle-ci est fugace et ne concerne qu'une fraction de la protéine totale à un instant donné.

Comme évoqué plus haut, il existe des circonstances dans lesquelles SUMO joue un rôle structural et modifie donc une part plus importante de la protéine cible. C'est le cas notamment de la protéine RanGAP1 au complexe du pore nucléaire. C'est également le cas de la protéine PML (ProMyelocytic Leukemia protein), dont l'histoire est étroitement liée à celle de la SUMOylation. PML est une protéine qui fut découverte au cours de travaux sur la leucémie aigüe à promyélocytes. Cette leucémie est la conséquence de la fusion de PML avec le récepteur à l'acide rétinoïque RAR $\alpha$ . Cette protéine de fusion empêche la différenciation des cellules qui l'arborent, provoquant ainsi la leucémie. La SUMOylation de PML-RAR $\alpha$  est essentielle à l'acquisition du phénotype leucémique (de Thé et al., 1990, 1991; Wang and Chen, 2008). La protéine PML a depuis été largement étudiée, et impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, la réponse aux dommages à l'ADN, la régulation de la transcription, l'apoptose ou la senescence (Bernardi and Pandolfi, 2007). De manière intéressante, il a été largement démontré que PML joue un rôle important dans la réponse antivirale. En effet, l'expression de *Pml* est induite par la signalisation qui résulte de la production d'interféron, qui est un pilier de la réponse antivirale (Chelbi-Alix et al., 1995; Stadler et al., 1995). De plus, des études génétiques utilisant des cellules ou des souris déficientes pour le gène *Pml* ont montré que celles-ci sont plus sensibles à des infections virales. C'est le cas par exemple du VSV (Vesicular Stomatitis Virus) et du LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) dont la réplication est augmentée dans les souris *Pml*<sup>-/-</sup> (Bonilla et al., 2002) ou encore de l'EMCV (EncephaloMyoCarditis Virus) dans les cellules *Pml*<sup>-/-</sup> (El Mchichi et al., 2010). A l'inverse, la surexpression de certaines isoformes de *Pml* confère des capacités antivirales accrues, comme l'isoforme PMLIb pour le virus de l'Herpes Simplex 1 (HSV-1), ou l'isoforme PMLIII pour le virus HFV (Human Foamy Virus), VSV, Influenza A et le virus de la Polio par exemple (Chelbi-Alix et al., 1998; McNally et al., 2008; Pampin et al., 2006; Regad et al., 2001).

PML est une protéine essentielle à la formation de structures subnucléaires, de nombre et de taille variable selon le type cellulaire et l'état de la cellule, appelées corps nucléaires PML. Leur existence est cruciale pour les fonctions de PML, et ces structures sont des points de recrutement d'autres protéines dont SP100 (Speckled Protein 100) et le corepresseur transcriptionnel Daxx, qui sont eux-mêmes des substrats de SUMOylation. PML peut être

SUMOylé sur trois lysines, ou deux selon ses isoformes, et la SUMOylation est essentielle à l'homéostasie des corps nucléaires PML (PML-NB – Nuclear Bodies – ). Ainsi, la surexpression d'un mutant non-SUMOylable de PML dans des cellules inactivées pour le gène *Pml* conduit à la formation d'agrégats géants de PML, dépourvus de SP100 et DAXX (Zhong et al., 2000). De plus, PML contient un domaine SIM. Le modèle actuel propose que SUMO joue un rôle de structure dans les PML-NB, en organisant les protéines PML entre elles et en favorisant l'interaction avec SP100, DAXX, et d'autres protéines au recrutement transitoire (figure 13)(Bernardi and Pandolfi, 2007)). Dans ce modèle, SUMO n'a pas un rôle d'intermédiaire réactionnel mais de structure, impliquant une modification stable.



**Figure 13 La SUMOylation joue un rôle d'organisation structurale dans les corps PML.** PML est SUMOylée sur trois résidus lysines, ce qui permet son interaction avec la protéine PML par l'intermédiaire d'un SIM, et avec ses partenaires *via* leurs propres SIM.

### **III. Rôles fonctionnels de la SUMOylation**

#### **A. Rôles de SUMO révélés par génie génétique**

La SUMOylation est un processus complexe, impliquant plusieurs enzymes, et évolutivement conservé chez les Eukaryotes. Ceci implique un ou plusieurs rôles fonctionnels important pour la modification post-traductionnelle de protéines par SUMO. La modification génétique de multiples organismes, en ciblant les enzymes essentielles à la SUMOylation, ont permis d'observer des phénotypes associés à une altération de la SUMOylation. Ces phénotypes sont répertoriés dans la table 4. Ainsi, l'on constate que les composants de la machinerie jouant un rôle unique, tels que SUMO, les sous-unités de l'enzyme E1, et l'enzyme E2, sont essentielles à la survie de l'organisme. Une déficience entraîne la plupart du temps deux phénotypes majeurs : un défaut de division cellulaire, et un défaut de réponse au stress, plus particulièrement aux dommages à l'ADN. En revanche, les déficiences en enzymes E3 montrent souvent des phénotypes plus modérés, indiquant une certaine redondance entre elles, au moins pour certaines fonctions essentielles, et permettant des analyses plus raffinées de leur fonction. Enfin, concernant les protéases, les données obtenues pour SENP1 soulignent l'importance de la maturation des précurseurs de SUMO, et l'importance également du caractère réversible de la SUMOylation, puisque cette enzyme semble être essentielle, au moins chez les organismes étudiés.

**Table 4 Récapitulatif des premières études génétiques de la voie SUMO**

Composant de la machinerie ciblé	Organisme	Gène	Phénotype	Références
SUMO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Smt3</i>	Létal (défauts mitotiques)	(Biggins et al., 2001)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Pmt3</i>	Défauts sévères de croissance : morphologie cellulaire et nucléaire aberrante, défaut de ségrégation chromosomique, défaut de centromères et kinétochores, télomères allongés	(Spirek et al., 2010)
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Smo-1</i>	Infertilité, malformation des gonades et de l'appareil reproducteur femelle	(Broday et al., 2004)
	<i>Mus musculus</i>	<i>Sumo1</i>	L'haploinsuffisance mène à l'apparition de fente labiale et palatine	(Alkuraya et al., 2006)
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Sumo1</i>	L'haploinsuffisance mène à l'apparition de fente labiale et palatine	
Enzyme E1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Aos1</i>	Létal	(Johnson et al., 1997)
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Uba2</i>	Arrêt du cycle cellulaire en G2/M	
	<i>S. pombe</i>	<i>Rad31</i>	Viable. Croissance ralentie, perte chromosomique, morphologie cellulaire et nucléaire anormale, hypersensibilité aux dommages à l'ADN	(Shayeghi et al., 1997)
	<i>C. elegans</i>	<i>Uba2</i>	Létalité embryonnaire	(Jones et al., 2002)
Enzyme E2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ubc9</i>	Arrêt de croissance en G2/M	(Seufert et al., 1995)
	<i>S. pombe</i>	<i>Hus5</i>	Anomalie mitotiques, sensibilités au stress (hydroxyurée et radiations ionisantes)	(al-Khodairy et al., 1995)
	<i>C. elegans</i>	<i>Ubc9</i>	Létalité embryonnaire	(Jones et al., 2002)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>dUbc9</i>	Défauts méiotiques ; activation des facteurs de transcription dl et dif apparentés à Rel.	(Apionishev et al., 2001; Chiu et al., 2005; Huang et al., 2005)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtSCE1</i>	Inhibition de croissance	
	<i>Gallus gallus</i>	<i>Ubc9</i>	Défauts de cytokinèse, apoptose	(Hayashi et al., 2002)
	<i>M. musculus</i>	<i>Ubc9</i>	Létalité embryonnaire	(Nacerddine et al., 2005)
Enzymes E3	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Siz1</i>	Viable	(Johnson and Gupta, 2001)
		<i>Siz2</i>	Viable	
		<i>Siz1/Siz2</i>	Croissance ralentie, thermosensible, défaut de sporulation	
	<i>S. pombe</i>	<i>Nse2</i>	Sensibilité à l'hydrourée et aux radiations ionisantes	(Stephan et al., 2011)
		<i>Pli1</i>	Sensibilité au TBZ, perte du mini chromosome, télomères allongés	(Xhemalce et al., 2004)
	<i>C. elegans</i>	<i>Gei-17</i>	Létalité embryonnaire, malformation	(Holway et al., 2006)
	<i>D. melanogaster</i>	<i>dPias</i>	Létal, défauts mitotiques, défauts d'association des télomères	(Hari et al., 2001)
	<i>A. thaliana</i>	<i>AtSiz1</i>	Défauts de réponse aux stress abiotiques et biotiques, défauts de développement	(Xu and Yang, 2013)
		<i>AtMms21</i>	Défauts de développement	
	<i>M. musculus</i>	<i>Pias1</i>	Augmentation de la réponse IFN et de la voie NF-kB	(Liu et al., 2004)
		<i>Piasy</i>	Viable, hypersensibilité au choc endotoxique	
<i>Pias1<sup>-/-</sup> ; Piasy<sup>-/-</sup></i>		Létalité embryonnaire (< E11,5)	(Tahk et al., 2007)	
<i>Pias1<sup>+/-</sup> ; Piasy<sup>-/-</sup> et Pias1<sup>-/-</sup> ; Piasy<sup>+/-</sup></i>		Augmentation de la réponse IFN et de la voie NF-kB		
<i>Piasx</i>		Réduction de la taille des testicules		
SUMO protéases	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ulp1</i>	Arrêt du cycle en G2/M	(Li and Hochstrasser, 1999)
		<i>Ulp2</i>	Anomalies morphologiques, hypersensibilité à la température, aux dommages à l'ADN	(Lee et al., 2011)
	<i>S. pombe</i>	<i>Ulp1</i>	Croissance lente, anomalies morphologiques nucléaires et cellulaires	(Taylor et al., 2002)
	<i>M. musculus</i>	<i>Senp1</i>	Létalité embryonnaire entre E12,5 et E14,5 ; anomalies placentaires	(Yamaguchi et al., 2005)
	<i>H. sapiens</i>	<i>Senp1</i>	Tératome	(Veltman et al., 2005)

## **B. SUMO et immunité innée**

### **a) Généralités sur l'immunité innée**

Chaque organisme métazoaire est en contact permanent avec des organismes microbiens qui le colonisent. Les mammifères constituent un véritable habitat pour ces organismes, avec des niches extrêmement variées comprenant la peau, le tractus digestif, le tractus respiratoire, urogénital, et les organes internes. Si le côlon et la peau sont colonisés de manière constitutive, les autres niches doivent être maintenues stériles. Ainsi, les niches colonisées ont co-évolué avec les microorganismes de manière à ce que leur interaction soit bénéfique, ou au minimum non délétère pour l'un et l'autre. La plus grande densité de colonisation microbienne est observée dans le colon, pour lequel jusqu'à plusieurs milliards de bactéries vivent en symbiose avec l'hôte, aidant aux fonctions digestives et empêchant l'invasion par des organismes aux conséquences négatives. Ces microorganismes collaborant avec l'hôte sont qualifiés de commensaux. En revanche, les microorganismes ayant des conséquences délétères pour l'hôte sont appelés pathogènes. La limite entre commensal et pathogène est cependant relativement fine, un microorganisme considéré comme commensal pouvant être pathogène dans certaines conditions.

Afin de lutter contre les microorganismes pathogènes, les mammifères ont développé un système immunitaire qui repose sur plusieurs lignes de défenses. La première est une barrière physique entre le milieu extérieur où résident les microorganismes et le milieu intérieur qui doit rester stérile. Cette barrière physique est constituée par la peau d'une part, et par les muqueuses d'autre part. Elle peut s'accompagner de mécanismes élaborés de défense, tels que la sécrétion de mucus empêchant l'attachement à la surface de l'épithélium, la production de peptides antimicrobiens, ou des mouvements mécaniques permettant l'évacuation des microorganismes.

La seconde ligne de défense est engagée lorsque des pathogènes sont présents et sont parvenus à entrer dans le milieu intérieur. C'est une défense composée notamment de cellules spécialisées parmi lesquelles on trouve des cellules dites « Natural Killer » ou cellules NK, qui peuvent provoquer l'apoptose de cellules infectées. On trouve également les cellules phagocytaires (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles) capables d'internaliser les pathogènes pour les dégrader. De plus, certaines cellules sont spécialisées dans la lutte contre les parasites, tels que les polynucléaires éosinophiles,



basophiles et les mastocytes. Cette seconde ligne de défense comprend également une composante non cellulaire à travers le système du complément. Le complément est une cascade protéolytique aboutissant principalement à l'opsonisation, autrement dit le ciblage pour phagocytose, d'un élément étranger. Tous ces mécanismes constituent l'immunité innée.

La dernière ligne de défense contre les pathogènes est représentée par l'immunité adaptative. Elle est médiée par les lymphocytes T et B et repose sur la reconnaissance fine du pathogène en présence à travers les récepteurs des cellules T (TCR – T Cell receptor) et les récepteurs des cellules B (BCR B Cell Receptors)(Medzhitov, 2007).

En revanche, l'immunité innée est médiée par la reconnaissance de molécules conservées chez de nombreux microorganismes pathogènes ou non, les « Pathogen Associated Molecular Patterns », ou PAMPs. La reconnaissance des PAMPs passe par l'engagement d'un Pattern Recognition Receptor, ou PRR, porté par la cellule. C'est une protéine qui reconnaît ces molécules spécifiques et, une fois engagée, déclenche une cascade de signalisation aboutissant à la réponse immunitaire. Les PRR peuvent être transmembranaire ou cytoplasmique. Les PRR transmembranaires sont regroupés sous la dénomination TLR pour Toll-Like Receptors. En effet, ces récepteurs possèdent une homologie avec le récepteur encodé par le gène *Toll* chez *Drosophila melanogaster*. L'histoire de la découverte de ces récepteurs est rapportée par O'Neill *et al.* dans une revue récente (O'Neill *et al.*, 2013). L'importance cruciale de ces récepteurs dans l'immunité innée est reconnue et Hoffmann, Beutler et Steinmann ont été récompensés du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour leurs travaux sur le sujet. Les PRR cytoplasmiques reconnaissent notamment les acides nucléiques étrangers présents dans le cytosol des cellules, tels que les ARN viraux, ou encore l'ADN, normalement absent du cytoplasme dans des cellules en quiescence. Ils sont regroupés sous la dénomination RLR pour « RIG-Like Receptors » pour l'ARN, et récepteurs à l'ADN. Enfin, une classe de PRR cytoplasmique capables de détecter des motifs bactériens(flagelline et composants du peptidoglycan par exemple) et divers signaux de danger non-bactériens (acide urique, efflux de potassium...) a également été décrites. Ils sont regroupés sous la dénomination NLR (NOD-Like Receptor) (Geddes *et al.*, 2009).

## **b) Macrophages et cellules dendritiques orchestrent la réponse aux pathogènes**

La mise en place d'une réponse immunitaire efficace repose sur la communication entre les cellules qui la composent. Cette communication passe par la production de cytokines, déversées dans le milieu extra-cellulaire, et reconnues par les cellules cibles. Les principaux

producteurs de cytokines en réponse à la détection d'un pathogène sont les macrophages et les cellules dendritiques, dans la mesure où ils expriment un large panel de PRR (Gordon, 2007; Medzhitov, 2007). De manière intéressante, ces cellules sont également capables de phagocyter un pathogène, afin de le digérer et de présenter ses antigènes à leurs surfaces, couplés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC classe I) ou de classe II (MHC classe II). Cette présentation, couplé à l'engagement de molécules de costimulation, parmi lesquelles les protéines transmembranaires CD40, B7, CD80 et CD86 par exemple, a pour effet d'activer la seconde phase de la réponse immunitaire, la réponse adaptative.

Les cellules dendritiques forment une population hétérogène de cellules présentatrices d'antigènes, aux propriétés phénotypiques et aux localisations variées. Elles sont divisées en deux grandes catégories : les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC « Plasmacytoid Dendritic Cells) et les cellules dendritiques conventionnelles (« cDC conventional/classical Dendritic Cells »). Les pDC sont présentes dans la circulation sanguine et dans les organes lymphoïdes, et produisent de grandes quantités d'interféron de type I lorsqu'elles reconnaissent des acides nucléiques de pathogènes. Les cDC s'accumulent dans quasiment tous les tissus où elles jouent un rôle de sentinelles pour détecter les pathogènes qui auraient traversé les barrières avec le milieu extérieur. Après avoir phagocyté un pathogène, elles migrent vers les ganglions lymphatiques pour mettre en place la réponse des cellules T. Elles sont elles-mêmes divisées en plusieurs sous-catégories (Merad et al., 2013). Une troisième catégorie de cellules dendritiques est également décrite. Il s'agit des cellules dendritiques inflammatoires (infDC), qui ont une courte durée de vie et qui se différencient à partir de monocytes circulant lors d'une inflammation (Segura and Amigorena, 2013).

Les monocytes servent également de précurseurs aux macrophages recrutés sur les lieux de l'inflammation. Les macrophages ont pour fonction la détection de pathogènes ou de lésions, la lutte contre les pathogènes et la résolution de l'inflammation. A ce titre, deux populations ontologiquement différentes co-existent : la population dérivées des monocytes, dont le passage au site d'inflammation est transitoire, à l'image des infDC, et la population résidente du tissu, qui provient de précurseurs locaux implantés dans chaque tissu au stade embryonnaire (Ginhoux and Jung, 2014). Ensemble, les monocytes, cellules dendritiques et macrophages composent le système des phagocytes mononucléés (MPS « Mononuclear Phagocytes System ») (van Furth et al., 1972).

L'étude des caractéristiques propres à chacun de ces lignages cellulaires a été rendu possible *in vitro* par l'utilisation de protocoles de différenciation de leurs précurseurs en

culture, en présence de molécules spécifiques. Ainsi, des cellules dendritiques correspondant phénotypiquement aux cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes peuvent être différenciées *in vitro* à partir de précurseurs présents dans la moëlle osseuse de souris en présence de Flt3L, une molécule également essentielle à leur différenciation *in vivo*. De manière similaire, la présence de GM-CSF (Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor) dans une culture de précurseurs présents dans la moëlle osseuse permet l'obtention d'une population ressemblant phénotypiquement aux cellules dendritiques inflammatoires. Cependant, *in vivo*, la différenciation des DC inflammatoires n'est pas dépendante du GM-CSF et ceci doit être gardé à l'esprit lors de l'utilisation de ce modèle, pour lequel les résultats obtenus demandent donc à être confirmés *in vivo* (Satpathy et al., 2012). Etant donné l'importance des cellules dendritiques inflammatoires dans la réponse à une agression par un pathogène, le large éventail de PRR qu'elles expriment, et le caractère pratique de leur différenciation *in vitro*, qui permet l'obtention d'une grande quantité de cellules à partir d'une souris donneuse et donc la réduction du nombre d'animaux utilisés, nous avons choisi d'utiliser ce modèle pour la majorité de notre étude.

### **c) Contrôle de la voie NF- $\kappa$ B par la SUMOylation**

La voie canonique déclenchée par l'engagement de la plupart des PRR est la voie NF- $\kappa$ B, évoquée précédemment. En présence de son ligand, un TLR recrute une molécule adaptatrice, MYD88 (« Myeloid differentiation primary-response protein 88 ») et parfois MAL (MYD88 Adaptor Like protein), grâce à son domaine TIR (Toll/IL-1 receptor) cytoplasmique. Les adaptateurs interagissent alors avec un complexe de kinases comprenant les protéines IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinases) et TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6), ce qui a pour effet de phosphoryler et ainsi activer les membres du complexe IKK. Celui-ci phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , provoquant sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome, libérant le facteur de transcription NF $\kappa$ B. Ce dernier transloque alors dans le noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles, et notamment des gènes encodant pour des cytokines pro-inflammatoires. Le complexe IKK et la voie NF $\kappa$ B peuvent également être activés par les RLR RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I) et MDA-5 (Melanoma Differentiation Factor 5), à travers la protéine adaptatrice MAVS (Mitochondrial Antiviral Signaling) (Goubau et al., 2013). Les NLR activent cette voie *via* la kinase RIP2 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2) (Hasegawa et al., 2008).

Plusieurs études ont démontré un impact de la SUMOylation sur cette voie, à commencer par l'effet de la SUMOylation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Dès 1998, soit dans les toutes premières années suivant la découverte de la SUMOylation, Desterro et al. ont montré que I $\kappa$ B $\alpha$  était SUMOylé par SUMO-1, inhibant la voie NF $\kappa$ B en stabilisant I $\kappa$ B $\alpha$ , suite à une stimulation par le TNF (Tumor Necrosis Factor), l'IL-1 (Interleukin-1), ou l'acide okadaïque, dans plusieurs lignées cellulaires humaines. Cette stabilisation serait le fruit de la compétition entre l'ubiquitination, entraînant la dégradation protéasome-dépendante d'I $\kappa$ B $\alpha$ , et la SUMOylation, sur la même lysine (Desterro et al., 1998). Ce mécanisme de stabilisation a par la suite été confirmé dans le cadre de cycle d'hypoxie et réoxygénation (Liu et al., 2009).

La modification de I $\kappa$ B $\alpha$  par SUMO2/3 est en revanche plus controversée. En effet, celle-ci semble dans un cas stabiliser I $\kappa$ B $\alpha$  dans le cadre de l'hypoxie. De manière surprenante, les auteurs observent que cette stabilisation est corrélée à l'augmentation de l'activité de la voie NF $\kappa$ B (Culver et al., 2010). Cette observation est partagée par un second groupe, dans le cadre de la stimulation de cellules humaines par le TNF $\alpha$ . Cependant dans cette étude, les auteurs observent des chaînes mixtes entre l'ubiquitine et SUMO2/3 sur I $\kappa$ B $\alpha$ , et l'augmentation de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , augmentant ainsi la transcription de gènes cibles de NF $\kappa$ B (Aillet et al., 2012). L'impact de la SUMOylation sur I $\kappa$ B $\alpha$  est donc incertain et peut mener, selon les systèmes utilisés, soit à une augmentation, soit à une diminution de l'activité de la voie.

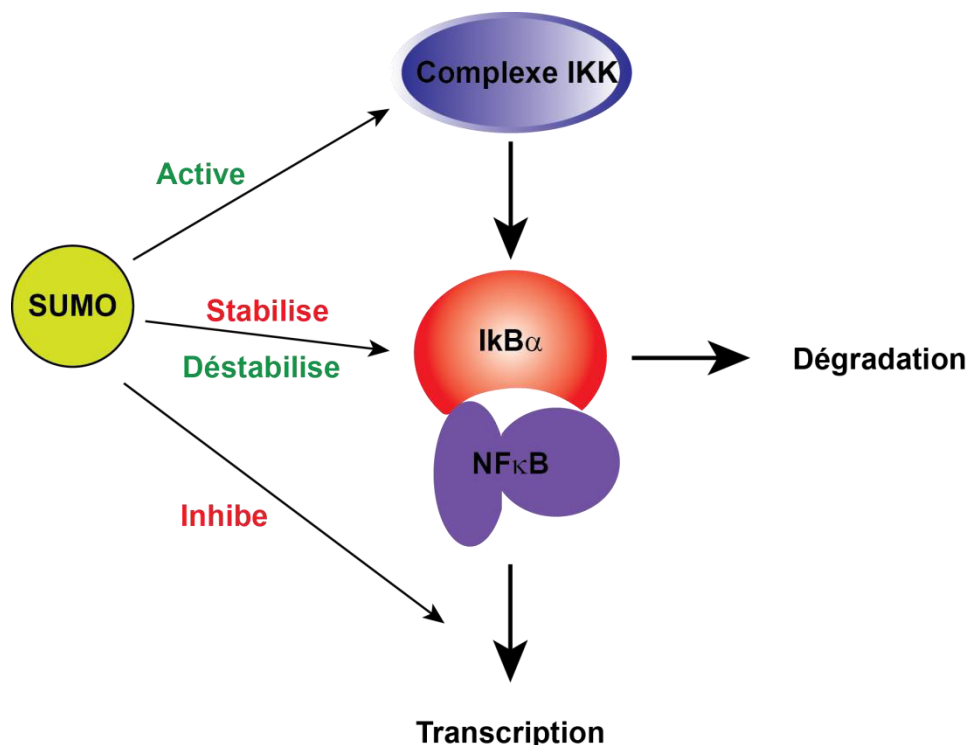
D'autre part, la SUMOylation de NEMO, membre du complexe IKK, a déjà été évoquée précédemment. Rappelons que les études concernant NEMO ont montré que sa modification par SUMO1 est nécessaire à l'activation de la voie dans la réponse à un stress génotoxique. Une étude récente a montré que NEMO peut également être SUMOylé par SUMO2/3. En stimulant des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) avec du lipopolysaccharide (LPS), ligand de TLR4, les auteurs ont observé que la diminution de SENP6 par ARN interférence (siRNA – short hairpin RNA) induisait une augmentation de la signalisation NF $\kappa$ B, traduite par la transcription accrue des gènes cibles, et la déstabilisation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . D'un point de vue mécanistique, SENP6 désSUMOyle NEMO, diminuant l'activation du complexe IKK (Liu et al., 2013). Dans ce cas précis, la SUMOylation semble donc jouer un rôle activateur de la voie.

De plus, la sous-unité activatrice de NF $\kappa$ B, RelA (aussi appelée p65), peut être SUMOylée par PIAS3 dans des fibroblastes embryonnaires murins stimulés par le TNF $\alpha$ .

Cette modification semble avoir principalement lieu sur les lysines 37 et 121/122, puisque des protéines recombinantes dans lesquelles ces lysines sont mutées en arginine ne peuvent plus être modifiées par SUMO. De manière intéressante, cette modification est dépendante de la stimulation des cellules par le  $\text{TNF}\alpha$ , et inhibe l'activation de la voie. Elle constituerait donc un nouveau mécanisme de régulation (Liu et al., 2012b).

Enfin, deux études du même groupe chez la *Drosophile* ont montré que le mutant de *dUbc9* présente un phénotype d'hyperprolifération des hémocytes et d'hypersecretion du peptide antifongique *Drosomycin*, phénotypes dépendants de *Dorsal* et *Dif*, les homologues de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Chiu et al., 2005). Si *Dorsal* lui-même peut être SUMOylé, semblant potentialiser son activité transcriptionnelle (Bhaskar 2002), la stabilité de la protéine Cactus, homologue d' $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , est réduite chez les mutants de *dUbc9* (Paddibhatla et al., 2010). On ignore encore cependant si la stabilisation de Cactus par *dUbc9* est similaire à celle observée chez les Mammifères.

La voie de signalisation  $\text{NF}\kappa\text{B}$  est donc contrôlée par la SUMOylation à divers niveaux et peut, selon les substrats étudiés et les systèmes utilisés, la potentialiser ou l'atténuer (Figure 14).



**Figure 14** Schéma récapitulatif des conséquences de SUMO sur la voie  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . La SUMOylation peut avoir un rôle positif sur la voie, en activant le complexe IKK ou en

déstabilisant I $\kappa$ B $\alpha$ , ou un rôle négatif, en stabilisant I $\kappa$ B $\alpha$  ou inhibant l'activité transcriptionnelle de NF $\kappa$ B.

#### **d) Contrôle de la voie IRF par la SUMOylation**

Les facteurs de transcription IRF (Interferon Response Factor) forment chez les mammifères une famille de neuf protéines (IRF1-9) capables de lier des séquences ISRE (Interferon-Stimulation Response Element). Ces séquences sont présentes dans les promoteurs de gènes de réponse aux interférons de type I (IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ), qui constituent le programme transcriptionnel majeur de la lutte antivirale, ainsi que dans les promoteurs des IFN de type I eux-mêmes (Honda and Taniguchi, 2006).

L'induction des IFN de type I est provoquée majoritairement par la détection d'acides nucléiques cytoplasmiques, correspondant à des génomes viraux. Ainsi, les RLR RIG-I et MDA-5 détectent les ARN viraux cytoplasmiques, par le biais de structures qui leur sont spécifiques (extrémité 5' triphosphate ou ARN double-brin), et recrutent la protéine adaptatrice MAVS. Celle-ci permet alors l'activation des kinases TBK1 (TANK-Binding Kinase I) ou IKK $\epsilon$  (Inhibitor of  $\kappa$ B Kinase epsilon) qui phosphorylent IRF3 ou IRF7. Ceux-ci forment alors un homodimère IRF3 ou un hétérodimère, transloquent dans le noyau et activent la transcription des gènes cibles. De même, les récepteurs aux ADN cytosoliques ont la capacité d'activer TBK1/IKK $\epsilon$  en interagissant avec la protéine adaptatrice STING (STimulator of INterferon Gene) ((Ikushima et al., 2013) pour revue).

De plus, les TLR3 et 4 peuvent recruter la protéine TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), qui elle-même recrute un complexe comprenant TBK1. Ceci aboutit à l'activation d'IRF3 par phosphorylation. Les TLR7 et 9 sont capables d'activer principalement IRF7 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, en interagissant avec MYD88, TRAF6 et les kinases de la famille IRAK (Ning et al., 2011). Enfin, les TLR peuvent également activer IRF5, qui est un facteur de transcription critique dans l'induction des gènes proinflammatoires (Takaoka et al., 2005). Cependant, les détails de la cascade de signalisation causant son activation sont encore inconnus.

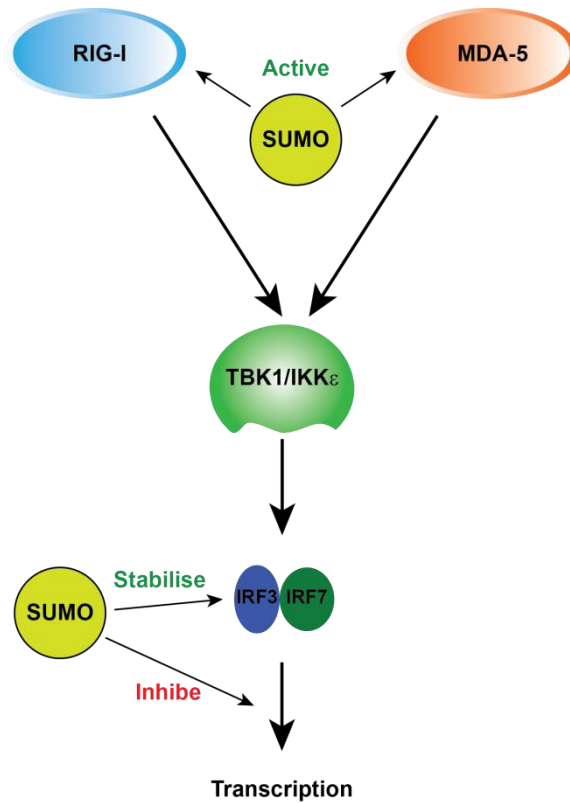
La SUMOylation intervient à plusieurs niveaux dans la signalisation IRF. Ainsi, les deux RLR majeurs RIG-I et MDA-5 peuvent être SUMOylés. La SUMOylation de RIG-I a pour effet d'augmenter sa polyubiquitination, celle-ci étant nécessaire à son activation. Ainsi

la SUMOylation de RIG-I aboutit à une augmentation de la production d'IFN de type I (Mi et al., 2010). De même, la reconnaissance d'acides nucléiques cytoplasmiques par MDA-5 provoque sa SUMOylation, et augmente sa capacité à stimuler la production d'interféron (Fu et al., 2011).

De plus, une étude a montré que la SUMO-protéase SENP2 joue un rôle important dans la signalisation IRF. En effet, sa surexpression diminue la production d'interféron de type I, et sa diminution potentialise la réponse antivirale. Le mécanisme proposé met en œuvre une compétition entre SUMO et l'ubiquitine sur les mêmes lysines d'IRF3. La polyubiquitination d'IRF3 entraînant sa dégradation par le protéasome, la SUMOylation des lysines 70 et 87 permet la stabilisation du facteur de transcription et augmente la signalisation (Ran et al., 2011).

A l'inverse, plusieurs études ont montré la capacité de certains virus à provoquer la SUMOylation des IRF, avec pour effet la régulation négative de la voie. Ainsi l'infection de cellules par le virus du VSV (Vesicular Stomatitis Virus) provoque la SUMOylation des protéines IRF3 et IRF7, et la mutation des lysines acceptrices de SUMO en arginine augmente la production d'IFN $\beta$  (interféron beta), suggérant un rôle répresseur de la SUMOylation sur leur activité transcriptionnelle (Kubota et al., 2008). De manière intéressante, la lysine cible observée dans cette étude diffère de la lysine cible de l'étude de Ran *et al.* précédemment évoquée. Ainsi les deux mécanismes, stabilisation d'IRF3 et modulation de son activité transcriptionnelle, ne sont pas mutuellement exclusifs et ne sont donc pas contradictoires. La SUMOylation d'IRF7 a fait l'objet de plusieurs études dans le cadre d'infections virales. Ainsi le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus Sendai (SV) et la protéine VP35 du virus Ebola causent la SUMOylation d'IRF7 et réduisent la transcription des gènes interféron de type I (Bentz et al., 2012; Chang et al., 2009; Liang et al., 2011) (Figure 15). Cependant, les observations divergent concernant la lysine ciblées par la SUMOylation (K406, K444, K446, K452). De manière similaire, l'activité transcriptionnelle de IRF2 et IRF8 est réduite par leur modification par SUMO (Chang et al., 2012; Han et al., 2008).

A nouveau, on observe un rôle de la SUMOylation à la fois activateur et répresseur de l'activité d'une voie de signalisation en aval des PRR.



**Figure 15 La SUMOylation régule la voie des IRF.** SUMO peut jouer un rôle activateur sur les senseurs intracytoplasmiques et stabiliser IRF3. SUMO peut inhiber la voie en réduisant l'activité transcriptionnelle d'IRF3 et IRF7.

#### e) La voie des MAPK est contrôlée par la SUMOylation

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) forment une famille de protéines à activité kinase regroupées en trois cascades, aboutissant respectivement aux kinases JNK (Jun N-terminal Kinase), p38 et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Ces kinases peuvent elles-même phosphoryler, directement ou par l'activation de nouvelles kinases, des facteurs de transcription impliqués notamment dans la transcription de gènes pro-inflammatoires. Parmi ces facteurs de transcription, on trouve principalement le complexe AP1 (Activator Protein 1). Le complexe AP1 est un hétérodimère formé par l'association de deux facteurs de transcription parmi FOS, JUN, ou les facteurs de transcription de la famille ATF.

La voie des MAPK correspond à une cascade de phosphorylation. Ces cascades peuvent être activées par les PRR, et les exemples les plus étudiés concernent l'activation par les TLR. De manière similaire à la voie NFκB décrite précédemment, les MAPK peuvent être activées



par le complexe des protéines IRAK et la protéine TRAF6. Cette signalisation aboutit d'une part à l'activation du complexe IKK, qui active la voie ERK, et d'autre part à l'activation d'un complexe comprenant notamment la kinase TAK1 (TGF $\beta$  Activated Kinase 1), capable d'activer les voies p38 et JNK ((Arthur and Ley, 2013) pour revue).

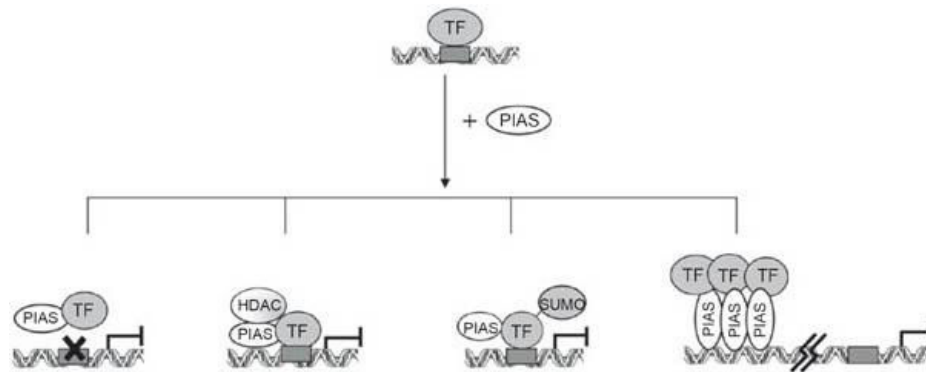
Une étude a montré que la kinase phosphorylant ERK, MEK1 (MAPK/ERK Kinase 1) est modifiée par SUMO dans le contexte de la transformation cellulaire par RAS. La SUMOylation de MEK diminue l'activation de la voie en empêchant l'interaction entre MEK et ERK (Kubota et al., 2011). De plus, les facteurs de transcription AP1, en aval des MAPK, sont régulés de manière négative par la SUMOylation. C'est par exemple le cas de FOS (FBJ Osteosarcoma oncogene), dont la SUMOylation diminue l'activité transcriptionnelle. En effet, une étude récente a montré, en utilisant un anticorps spécifique de FOS SUMOylé, que celui est constamment présent au niveau des promoteurs des gènes cibles, et sa concentration au promoteur augmente lors de l'induction de la voie. Cependant, la surexpression d'un mutant non-SUMOylable de FOS aboutit à une augmentation de la transcription par FOS. Les auteurs proposent que la forme SUMOylée du facteur de transcription, supposée inactive, joue un rôle de tampon au niveau du promoteur des gènes cibles, tempérant le recrutement du facteur de transcription non-modifié et donc l'expression du gène cible (Tempé et al., 2014). Dans le cas de la signalisation MAPK, la SUMOylation joue donc un rôle répressif, que ce soit au niveau de la transduction du signal, ou directement sur le facteur de transcription.

#### **f) La famille des PIAS, SUMO E3 ligases et inhibitrices de l'immunité innée**

La famille des protéines PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) est une famille au rôle intrigant. Initialement décrite comme inhibiteurs des protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), cruciale dans la signalisation induite par les cytokines (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998), il est maintenant démontré qu'elles interagissent avec plusieurs dizaines de protéines, principalement des facteurs de transcription, et qu'elles jouent un rôle important dans la régulation de la SUMOylation, formant à l'heure actuelle la plus grande famille de SUMO E3 ligases (Shuai and Liu, 2005). Leur activité inhibitrice de la transcription est mise en place par différents mécanismes. Les PIAS peuvent empêcher la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN. Ainsi, des expériences de retard sur gel, ainsi que des co-immunoprécipitations ont montré que PIAS1 interagit avec STAT1, et PIAS3 avec STAT3, et empêchent leur liaison aux séquences cibles de ces facteurs de transcription aux promoteurs (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998). Les

PIAS peuvent également inhiber la transcription en recrutant des partenaires répresseurs telles que les histones déacétylases, comme c'est le cas pour PIASy et PIASx qui inhibent STAT1 et STAT4 (Arora et al., 2003; Liu et al., 2001). Elles peuvent induire la SUMOylation du facteur de transcription : ainsi pour une sous-catégorie définie de gènes induits par l'IFN $\gamma$  (interféron gamma), l'inhibition de STAT1 par PIAS1 est dépendante de la SUMOylation (Ungureanu et al., 2005). Enfin, la surexpression de PIASy provoque l'apparition de structures subnucléaires ponctiformes, dans lesquelles le facteur de transcription LEF1 (Lymphoid Enhancer Factor 1) SUMOylés est recruté, inhibant totalement son activité transcriptionnelle (Sachdev et al., 2001). Ce dernier exemple constitue le quatrième mécanisme par lequel les protéines de la famille PIAS peuvent inhiber l'activité d'un facteur de transcription. Les mécanismes décrits pour l'inhibition de la transcription par les PIAS, incluant la SUMOylation des facteurs de transcription, sont illustrés dans la figure 16.

De manière intéressante, les souris déficientes en *Pias1* (*Pias1*<sup>-/-</sup>) présentent une augmentation de l'expression des gènes de réponses aux interférons, après stimulation avec l'IFN $\gamma$  (type II) ou IFN $\beta$  (type I). Les souris sont résistantes à une infection virale par le VSV et bactérienne par *Listeria monocytogenes*. En revanche, elles sont hypersensibles au choc endotoxique provoqué par l'injection de LPS dans le péritoine. Bien que les souris ne présentent pas de défaut global de la SUMOylation, l'étude n'évalue pas l'importance de l'activité E3 ligase de PIAS1, et il aurait été intéressant de compléter les cellules *Pias1*<sup>-/-</sup> avec un mutant de *Pias1* E3-ligase-déficient (Liu et al., 2004). PIAS1 régule également l'expression d'une partie des gènes cibles de NF $\kappa$ B en empêchant son recrutement sur l'ADN (Liu et al., 2005), tout comme PIASy (Tahk et al., 2007). Il est intéressant de noter que PIAS1 et PIASy jouent un rôle important et partiellement redondant dans le contrôle de la réponse immunitaire innée, puisque, si le double mutant *Pias1*<sup>-/-</sup>; *Piasy*<sup>-/-</sup> est létal au stade embryonnaire, la délétion d'un seul allèle de *Pias1* (*Pias1*<sup>+/-</sup>) sur fond *Piasy*<sup>-/-</sup> est viable, et vice versa, mais présente une exacerbation du phénotype proinflammatoire de chaque mutant. Ainsi PIAS1 et PIASy collaborent dans le contrôle de la transcription dépendante des facteurs de transcription STAT et NF $\kappa$ B (Tahk et al., 2007).



**Figure 16 Inhibition de la transcription par les protéines PIAS.** De gauche à droite, les PIAS peuvent empêcher la liaison d'un facteur de transcription aux promoteurs, recruter des corépresseurs, SUMOyler les facteurs de transcription ou les séquestrer dans des structures subnucléaires éloignées des promoteurs.

### g) SUMOylation et activité anti-inflammatoire des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription régulés directement par un ligand. Ils existent donc sous la forme holo-enzyme, libre, et apo-enzyme, liée par le ligand. Ils régulent l'expression de nombreux gènes cibles et peuvent être activateur ou répresseur selon la présence ou non du ligand. Cette fonction de contrôle de la transcription passe par le recrutement de corégulateurs. Plusieurs études ont montré l'importance de la SUMOylation dans ces mécanismes, et particulièrement dans le cadre de la réponse inflammatoire. Ainsi, en présence de ses ligands synthétiques, la rosiglitazone ou le GW0072, le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator activated receptor gamma) est modifié par SUMO1 de manière PIAS1-dépendante, puis recruté au niveau des gènes cibles, où le complexe corepresseur NCoR inhibe la transcription. Le recrutement de PPAR $\gamma$  SUMOylé empêche la polyubiquitination du complexe corépresseur, et donc sa dégradation par le protéasome. Ceci stabilise le corepresseur sur le promoteur des gènes cibles et empêche la transcription.

De manière analogue, le récepteur aux oxystérols LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Liver-X-Receptor alpha et beta) sont modifiés par SUMO2/3 en présence de leur ligand. De manière identique à PPAR $\gamma$ , cette SUMOylation empêche la libération des promoteurs cibles du complexe corepresseur, et inhibe ainsi la transcription (Ghisletti et al., 2007; Pascual et al., 2005).

## **h) Régulation transcriptionnelle par SUMO à la chromatine**

Le génome est organisé sous forme de chromatine, association d'ADN et de protéines qui permettent sa compaction et sa régulation. Les protéines majeures constituant la chromatine sont appelées histones. Elles sont regroupées en octamères autour desquels s'enroule la double-hélice d'ADN, formant ainsi un nucléosome. Elles sont fortement soumises aux modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation ((Kouzarides, 2007) pour revue). La SUMOylation des histones est conservée de la levure aux mammifères. Chez l'Homme, la SUMOylation de l'histone H4 est associée au recrutement d'histones déacétylases (HDAC) et de HP1 $\gamma$  (Heterochromatin Protein 1 gamma), et réprime la transcription dans des expériences de SUMOylation forcée aux promoteurs (Shiio and Eisenman, 2003). Chez la levure, les quatre histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) peuvent être SUMOylées, et on les retrouve principalement dans les régions subtélomériques non transcrites et au niveau des gènes inductibles réprimés (Nathan et al., 2006).

Nous avons précédemment évoqués qu'une grande partie des substrats de la SUMOylation regroupe des facteurs de transcription. Dans la plupart des cas, la modification a un effet répresseur sur l'activité de ces facteurs, cependant quelques exemples démontrent que l'effet de SUMO est dépendant du contexte, incluant le substrat, le promoteur et les cofacteurs en présence. Des exemples, non-exhaustifs, illustrant le rôle contexte-dépendant de la SUMOylation de facteurs de transcription sont regroupés dans la table 5.

**Table 5 Exemples de rôles activateurs et répresseurs de la SUMOylation de facteurs de transcription**

Activation		Répression	
Facteurs de transcription	Références	Facteurs de transcription	Références
HSF1 – HSF2 (Heat Shock Factor 1 et 2)	(Goodson et al., 2001; Hong et al., 2001)	C/EBP	(Kim et al., 2002)
NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)	(Terui et al., 2004)	c-Jun	(Muller et al., 2000)
TCF4 (Transcription factor 4)	(Yamamoto et al., 2003)	ELK-1	(Yang et al., 2003)
TP53 (Tumor Protein 53)	(Bischof et al., 2006)	STAT1	(Ungureanu et al., 2005)

La SUMOylation peut également influencer l'activité de régulateur globaux de l'expression des gènes. Par exemple, la SUMOylation de DNMT1 (DNA Methyl Transferase 1), augmente son activité et augmente donc la méthylation de l'ADN, qui est un mécanisme répandu pour bloquer de manière efficace et à long terme l'expression des gènes (Lee and Muller, 2009). Elle permet le recrutement de répresseurs, tels que les protéines d'hétérochromatine HP1 (Stielow et al., 2008, 2010), des complexes corepresseurs (Ouyang et al., 2009) ou des histones déacétylases (HDAC) (Nathan et al., 2006). La SUMOylation peut aussi permettre la déméthylation de l'ADN par un mécanisme encore inconnu mais dépendant de l'ubiquitine E3 ligase SUMO-dépendante (STUb1) RNF4 (RING Finger protein 4) (Hu et al., 2010).

De plus, plusieurs études récentes se sont intéressées à la présence de SUMO à la chromatine, indépendamment du substrat modifié. Utilisant la méthode du ChIP (ImmunoPrecipitation de la Chromatine), cette approche a permis d'observer pour la première fois, chez la levure *S. cerevisiae*, que SUMO est présent sur tous les promoteurs des gènes actifs, qu'ils soient constitutifs ou induits, mais absents des gènes réprimés ou non induits. Cette observation tranche avec l'idée répandue que SUMO est un répresseur transcriptionnel.

De plus, en inactivant UBC9, les auteurs montrent que la perte de la SUMOylation aux promoteurs de gènes constitutivement exprimés réduit le recrutement de l'ARN polymérase II et diminue leur transcription. En revanche, la dynamique de SUMOylation semble être différente entre les gènes constitutifs et les gènes inductibles. Si les premiers ne montrent pas de recrutement d'UBC9 à leur promoteur (Rosonina et al., 2010), suggérant une SUMOylation des facteurs de transcription antérieure à leur fixation au promoteur, les derniers montrent un recrutement d'UBC9 et suggèrent donc une SUMOylation active lors de l'induction d'un gène. De plus, l'inactivation d'UBC9 provoque une transcription accrue de ces gènes. Selon ces résultats, la SUMOylation joue un rôle double : dans un cas, des facteurs SUMOylés lient les promoteurs des gènes constitutifs, permettant le recrutement de la machinerie de transcription. Dans l'autre, l'induction des gènes provoque une SUMOylation *in situ*, et provoque le recrutement de corepresseurs. Dans une étude suivant ces travaux, les auteurs décrivent un mécanisme dans lequel l'activateur transcriptionnel Gcn4 est recruté sur les promoteurs des gènes inductibles, puis SUMOylé de manière concomitante à l'arrivée de l'ARN polymérase II (RNAPOLII). La SUMOylation déclenche une cascade de modifications, d'abord sa phosphorylation puis sa polyubiquitination, permettant finalement sa dégradation par le protéasome. Ainsi, le recrutement de RNAPOLII par Gcn4 est rapidement diminué (Rosonina et al., 2012).

Chez l'Homme, des approches de ChIP combinées à du séquençage à haut débit ont permis d'obtenir des informations sur le profil de liaison de SUMO sur le génome. Ainsi, notre laboratoire a montré qu'il existe une forte corrélation entre les régions liées par SUMO et les promoteurs actifs, une caractéristique préalablement observée par un autre groupe (Liu et al., 2012a; Neyret-Kahn et al., 2013). Cependant, les conclusions divergent quant à la fonction de SUMO aux promoteurs des gènes actifs. Si un groupe a décrit la diminution de l'expression des gènes concernés lors de la diminution de la SUMOylation, à l'inverse, les résultats de notre laboratoire montrent une augmentation de l'expression des gènes les plus fortement marqués par SUMO, encodant pour les histones, les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert et les gènes impliqués dans la synthèse protéique. Il est probable que ce désaccord trouve son explication dans le fait que l'étude de Liu *et al.* observe les effets de la déplétion de SUMO1 seulement sur l'expression des gènes, tandis que l'étude par Neyret-Kahn *et al.* a choisi de diminuer l'expression de l'E2 UBC9, réduisant ainsi la SUMOylation globale, par tous les paralogues.

Ces études positionnent clairement SUMO à la chromatine et lui attribuent un rôle conflictuel mais important dans la régulation de l'expression des gènes.

## **C. SUMO et cancer**

### **a) Associations physiopathologiques**

La SUMOylation joue un rôle dans la majeure partie des processus de biologie de la cellule. De nombreuses études ont tenté d'établir des connexions entre la SUMOylation et divers types de cancers. A ce jour, les meilleurs exemples du rôle avéré de la SUMOylation dans certains cancers concernent la leucémie aigüe promyélocytaire (LAP), et le cancer de la prostate. Dans un premier temps, ces deux exemples seront explicités, puis les liens entre SUMO et d'autres types de cancer seront brièvement résumés.

#### **1. La leucémie aigüe promyélocytaire**

La LAP est une leucémie à progression rapide, à faible incidence (environ 100 nouveaux cas par an en France), aux conséquences graves mettant en jeu le pronostic vital, causant notamment d'importantes hémorragies. Elle est causée par des translocations chromosomiques produisant des protéines de fusion. Celles-ci impliquent systématiquement le récepteur à l'acide rétinoïque alpha (RARA). Dans la très grande majorité des cas (>98%) la translocation impliquée est t(15 ;17), produisant la protéine de fusion PML/RARA (de Thé et al., 1990, 1991). Nous avons précédemment évoqué la protéine PML, qui est un des substrats de SUMOylation les mieux caractérisés. L'oncoprotéine PML/RARA est responsable de la non-différenciation et de la prolifération des promyélocytes (Brown et al., 1997; Grisolano et al., 1997). La thérapie utilisée pour la LAP constitue le premier exemple de thérapie ciblée. Elle consiste en l'association de l'acide rétinoïque et de l'arsenic, provoquant la dégradation de PML/RARA en ciblant respectivement la partie RARA et PML (de Thé and Chen, 2010). Ce traitement permet la rémission complète de la quasi-totalité des patients atteints de LAP (Tallman and Altman, 2009).

D'un point de vue mécanistique, l'arsenic provoque la polySUMOylation de PML. Ceci permet l'interaction avec la STUbL RNF4, par l'intermédiaire de son domaine SIM. RNF4 entraîne la polyubiquitination de PML et PML/RARA, aboutissant à leur dégradation par le protéasome (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008). Ainsi, SUMO joue un rôle déterminant dans le traitement de la LAP.



## 2. Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le plus répandu chez l'Homme dans les pays développés. La voie principalement impliquée dans le risque de développer un cancer de la prostate est la signalisation par les androgènes (Nelson et al., 2003). La SUMOylation semble être particulièrement impliquée dans le cancer de la prostate. En effet, la désSUMOylase SENP1 est fortement induite dans la plupart des cas de cancer de la prostate (Cheng et al., 2006; Wang et al., 2013). Cette élévation fait suite à l'inductibilité du gène *Senp1* par les androgènes et par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6). D'un point de vue moléculaire, SENP1 augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes par un mécanisme HDAC1-dépendant (Cheng et al., 2004). De plus, SENP1 augmente l'activité transcriptionnelle de l'oncogène c-Jun. Enfin, l'augmentation de SENP1 est associée à l'augmentation de la cycline D1, favorisant la progression dans le cycle cellulaire. Il a été démontré que les conséquences de l'augmentation de SENP1 sont dépendantes de son activité SUMO-protéase (Cheng et al., 2006). Enfin, une étude chez la souris a montré que la surexpression de SENP1 dans la prostate, à l'aide d'un transgène inductible par les androgènes, conduit à une augmentation des lésions dites « néoplasies intra-épithéliales prostatiques (PIN) », précurseurs du cancer de la prostate. Mécanistiquement, en plus de l'augmentation de l'expression des cibles du récepteur des androgènes, les auteurs décrivent une stabilisation du facteur de transcription pro-angiogénique HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible-Factor 1 alpha), et une augmentation de l'expression de *Vegf* (Vascular Endothelial Growth Factor). Ceci favorise l'angiogenèse, facteur important dans le développement des néoplasies (Bawa-Khalfe et al., 2010). Enfin, un fort niveau d'expression de SENP1 corrèle avec un mauvais pronostic pour le cancer de la prostate (Wang et al., 2013). Ceci place à nouveau la SUMOylation au centre de la physiopathologie d'un cancer fortement répandu. Cependant dans ce cas, la SUMOylation semble diminuer l'oncogenèse et la progression tumorale, puisque c'est la surexpression d'une désSUMOylase à laquelle est associé le développement du cancer de la prostate.

## 3. Autres cancers

La SUMOylation a été associée à plusieurs types de cancers par de nombreuses études, basées pour la plupart sur une approche transcriptomique ou sur une approche immunohistochimique. Le tableau ci-dessous synthétise, de manière non-exhaustive, la plupart des associations observées à ce jour.

**Table 6 Dérégulation des acteurs de la SUMOylation dans différents types de cancers**  
(adapté et mis à jour d'après (Lee et al., 2009))

<b>Protéine dérégulée</b>	<b>Sens de la dérégulation</b>	<b>Type de cancer</b>	<b>Références</b>
<b>SUMO1</b>	Augmenté	Lymphome anaplasique à grandes cellules	(Villalva et al., 2002)
		Côlon	(Zhang et al., 2013)
<b>SUMO2, SAE2</b>	Augmentés	Carcinome hépatocellulaire	(Lee and Thorgeirsson, 2004)
<b>UBC9</b>	Augmenté	Cancer de l'ovaire	(Mo et al., 2005)
		Adénocarcinomes pulmonaires	(McDoniels-Silvers et al., 2002)
		Leucémie Myéloïde Aigüe (LMA) avec mutations du gène Cebpa	(Geletu et al., 2007)
		Mélanome	(Moschos et al., 2007)
		Tumeurs primaires du côlon et de la prostate	(Moschos et al., 2010)
<b>UBC9</b>	Diminué	Métastases de cancers du sein, de la prostate et du poumon	(Moschos et al., 2010)
<b>PIAS3</b>	Augmenté	Cancers des poumons, du sein, de la prostate, du colon, du rectum et du cerveau	(Wang and Banerjee, 2004)
<b>PIASy</b>	Diminué	Syndrome myélodysplasique	(Ueda et al., 2003)
<b>SENP1</b>	Augmenté	Adénome oncocytaire thyroïdien	(Jacques et al., 2005)
		Cancer de la prostate	(Cheng et al., 2006)

## **b) SUMO et dommages à l'ADN**

Les cancers sont causés par des anomalies génétiques qui résultent le plus souvent de dommages à l'ADN mal réparés, causant des mutations. Le génome subit constamment des dommages dus à des agents mutagènes endogènes (par exemple les espèces réactives de l'oxygène produites lors d'un stress) ou exogènes, tels que la fumée du tabac, les rayons ultraviolets, ou des produits chimiques naturels (par exemple l'aflatoxine) ou synthétiques. Cette exposition permanente à un risque de mutation implique pour la cellule de pouvoir reposer sur une réparation fidèle et efficace de son ADN (Stratton et al., 2009). La SUMOylation est impliquée dans plusieurs mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (DDR « DNA Damage Repair »).

Le premier exemple est la SUMOylation de PCNA lors de la réparation couplée à la réplication, exemple que nous avons déjà évoqué ici, et pour lequel la SUMOylation de PCNA entre en compétition avec l'ubiquitination pour empêcher une recombinaison inopportune.

Un second exemple concerne le rôle de SUMO dans la réparation par excision de base (BER « Base Excision Repair »). Ce type de réparation intervient lorsqu'une des bases de l'ADN est endommagée ou mal appariée, et consiste en l'excision de cette base par une glycosylase, produisant un site dit « abasique », puis par son remplacement. L'enzyme Thymine-DNA-Glycosylase (TDG) excise les bases thymine ou uracil improprement appariées à des cytosines ou guanines, puis reste fortement liée au site abasique. La SUMOylation de TDG est nécessaire à la diminution de l'affinité de TDG pour ce site, induisant son relargage et permettant aux enzymes impliquées dans la suite du processus d'accéder à la base excisée (Baba et al., 2005; Steinacher and Schär, 2005).

De plus, de nombreuses études ont impliqué la SUMOylation dans la réparation des cassures double-brins. Ainsi, chez la levure, la SUMOylation de la protéine Rad52 la protège de la dégradation et la conserve hors des nucléoles. Ceci empêche la réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue avec les séquences répétées localisées dans les nucléoles (Torres-Rosell et al., 2007).

Une étude systématique des substrats de SUMOylation impliqués dans la DDR a été réalisée chez la levure *S. cerevisiae*. Les auteurs ont ainsi identifié 67 substrats, répertoriés dans le tableau ci-dessous. De manière intéressante, les substrats identifiés appartiennent à six mécanismes différents de réparation, et différentes étapes de réplication. De plus, ils ont

montré que des mutants déficients pour la SUMOylation, à travers l'invalidation d'Ubc9 ou des enzymes E3 Siz1 et Mms21, présentent une hypersensitivité à l'agent alkylant méthylméthanesulfonate (MMS) ou à l'agent bloquant la réplication hydroxyurée (HU). Cette étude place la SUMOylation au cœur de la réponse aux dommages à l'ADN (Cremona et al., 2012).

**Table 7 Substrats de SUMOylation impliqués dans la réparation de l'ADN chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.** Les protéines en gras ont des homologues humaines SUMOylées. Les protéines soulignées peuvent être phosphorylées. Les protéines dont la SUMOylation est induite par le traitement au MMS sont en italique. Reproduit et traduit de (Cremona et al., 2012)

Mécanisme	Protéine SUMOylée
Réplication	<i><b>Dpb11</b></i> , <b>Mcm2</b> , <b>Mcm4</b> , Mcm5, <b>Mcm6</b> , <i>Mgs1</i> , <b>Orc2</b> , <b>Orc4</b> , <b>Orc6</b> , <i>Pif1</i> , <b>Pol1</b> , Pol2, Pol12, Pol32, <i>Pri1</i> , <b>Pri2</b> , <b>Rad27</b> , Rfc2, Rfc3, <i>Rtt107</i> , <i>Slx4</i> , <b>Abf1</b> , <b>Orc3</b> , Pob3, <b>Rfc1</b> , <b>Tof2</b> , <b>Top1</b> , <b>Top2</b>
Recombinaison	<i><b>Mre11</b></i> , <i>Pso2</i> , <i>Rad50</i> , <i>Sae2</i> , Saw1, <b>Smc6</b> , <i>Xrs2</i> , <i>Yen1</i> , <b>Rad52</b> , <i>Rad59</i> , <b>Rfa1</b> , <i>Rfa2</i> , <b>Sgs1</b> , <b>Smc5</b> , <i>Srs2</i>
Jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ)	<b>Lif1</b> , <b>Yku70</b> , <b>Yku80</b>
Réparation postréplicative	Rad5, <b>Pol30</b>
Réparation par excision de base	<i>Apn1</i> , <i>Mag1</i> , <i>Ogg1</i> , ( <i>Ntg1</i> )
Réparation par excision de nucléotide	<b>Rad1</b> , <b>Rad2</b> , Rad3, <b>Rad4</b> , <i>Rad7</i> , Rad25, <i>Ssl1</i> , <i>Tfb2</i> , <b>Rad16</b>
Réparation des mésappariement	<i>Mlh1</i> , <i>Msh3</i> , <b>Msh6</b> , <i>Pms1</i>
Points de contrôle (checkpoint signaling)	<i>Ddc1</i> , <i>Dun1</i>

Enfin, une étude récente par Psakhye et Jentsch a fait émerger de la réponse aux dommages à l'ADN un concept intéressant pour la SUMOylation. Partant de l'observation que les mutants non-sumoylables des protéines impliquées dans la réparation par recombinaison homologue ne présentent qu'un léger phénotype, les auteurs ont montré,

notamment par des études de spectrométrie de masse, que la SUMOylation des dites protéines s'effectue lors de leur recrutement sur l'ADN, sur virtuellement n'importe quelle lysine des substrats, et sert à renforcer la cohésion du complexe de réparation, augmentant son efficacité. Les auteurs proposent le concept de SUMOylation d'un groupe de protéine, plutôt que de la SUMOylation d'un substrat individuel. Ainsi, seul l'abolition de la SUMOylation permet d'obtenir un phénotype drastique suite à des cassures double-brins, et non pas la mutation de tel ou tel substrat individuel (Psakhye and Jentsch, 2012).

Le nombre croissant de démonstrations de l'implication de SUMO dans la réparation des dommages à l'ADN suggère qu'une dérégulation de la SUMOylation pourrait avoir un rôle dans l'initiation du processus d'oncogenèse, en favorisant l'accumulation de mutations ou en empêchant la survie de cellules portant des mutations.

### **c) La SUMOylation est importante dans l'angiogenèse**

Les cellules tumorales prolifèrent rapidement, créant de grandes masses cellulaires pour lesquels l'apport de la circulation sanguine devient limité. Elles sont cependant capables d'induire la formation de nouveaux vaisseaux et accéder ainsi à l'oxygène du sang, notamment. Cette capacité d'angiogenèse est gouvernée en partie par un facteur de transcription, HIF1 (Hypoxia-Induced Factor 1), dont la sous-unité alpha (HIF1 $\alpha$ ) est inductible par manque d'oxygène. La SUMOylation semble contrôler l'angiogenèse principalement par la régulation d'HIF1 $\alpha$ . Cependant, les conclusions quant à son rôle pro-angiogénique ou anti-angiogénique sont controversées.

Initialement, Bae *et al.* ont démontré que la SUMOylation d'HIF1 $\alpha$  par SUMO1 permet sa stabilisation et augmente son activité transcriptionnelle (Bae et al., 2004). Ce rôle a été confirmé par la suite par plusieurs groupes. La protéine RSUME permet d'augmenter la SUMOylation globale, et notamment la SUMOylation de HIF1 $\alpha$ , ce qui permet sa stabilisation et l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Carbia-Nagashima et al., 2007). La surexpression de SUMO1 provoque l'augmentation de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur clé dans l'angiogenèse, en augmentant l'activation de ERK1/2, MMP13 et la voie JAK2/STAT5 (Yang et al., 2013). Enfin, récemment, un groupe a démontré que la SUMO E3 ligase CBX4 (Pc2) augmente la SUMOylation d'HIF1 $\alpha$  dans des cellules d'hépatocarcinome cellulaire, ce qui a pour conséquence d'augmenter la production de VEGF, de manière SUMO-dépendante. Cette étude présente également une corrélation

entre le niveau d'expression de CBX4 dans des échantillons d'une large de cohorte de patients (n = 727) et l'expression de VEGF, ainsi que l'association d'une surexpression de CBX4 avec un mauvais pronostic de survie chez ces patients (Li et al., 2014).

A l'inverse, plusieurs groupes ont attribué à la SUMOylation d'HIF1 $\alpha$  un rôle inhibiteur de la voie. Ainsi, en remplaçant HIF1 $\alpha$  endogène par la surexpression d'un mutant non-SUMOylable d'HIF1 $\alpha$  dans des cellules HeLa, Berta *et al.* n'ont pas trouvé de déstabilisation dans le mutant, et ont observé une diminution de son activité transcriptionnelle (Berta et al., 2007). De même, un autre groupe a montré que des fibroblastes embryonnaires murins déficients pour la déSUMOylase SENP1 présentent un défaut de stabilisation de HIF1 $\alpha$ , ce qui suggère que la SUMOylation déstabilise HIF1 $\alpha$ . De plus, l'expression de SENP1 est induite par l'hypoxie. Enfin, la SUMO E3 ligase PIASy semble être impliquée dans la SUMOylation de HIF1 $\alpha$ , et les auteurs observent une corrélation inverse entre la surexpression de PIASy et l'angiogenèse dans des biopsies de cancers colorectaux (Cheng et al., 2007; Kang et al., 2010; Xu et al., 2010).

Bien que les conséquences soient incertaines selon le système choisit, la SUMOylation de HIF1 $\alpha$  joue clairement un rôle dans l'angiogenèse.

#### **d) Relations entre la SUMOylation et les oncogènes et suppresseurs de tumeurs**

La SUMOylation peut modifier et affecter la fonction de plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs classiquement étudiés. C'est notamment le cas du complexe AP1, composé des proto-oncogènes c-Fos et c-Jun (Eferl and Wagner, 2003). Ainsi, c-Fos est SUMOylé sur la lysine 265, la SUMOylation de c-Jun a été décrite sur les lysines K257 et/ou K229 (Bossis et al., 2005; Muller et al., 2000). De manière invariable, la SUMOylation diminue l'activité transcriptionnelle du complexe AP1, comme en attestent les expériences de gènes rapporteurs en conditions de surexpression de mutants non-SUMOylables ou de fusions avec les groupements SUMO. Récemment, Tempé *et al.* ont étudié la SUMOylation de c-Fos en conditions d'expression endogène de la protéine, grâce à la conception d'un anticorps reconnaissant spécifiquement c-Fos SUMOylé. De manière intéressante, les auteurs observent un recrutement concomitant de la forme SUMOylée et non SUMOylée sur les promoteurs des gènes cibles, rapidement après la stimulation des cellules par le 12-O- tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). En absence de SUMOylation, accomplie par diminution d'Ubc9 par ARN interférence, l'expression des gènes rapporteurs artificiels (luciférase) et endogène (Gadd153)

est fortement augmentée. Ceci suggère que la SUMOylation de c-Fos aux promoteurs des gènes cibles joue un rôle de tampon pour réguler leur expression (Tempé et al., 2014).

Les conclusions sont plus controversées quant au rôle de la SUMOylation de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). La protéine PTEN exerce son rôle suppresseur de tumeur en inhibant la signalisation PI3K (PhosphoInositide 3 Kinase)/AKT, axe qui favorise la survie et la prolifération cellulaire. Plusieurs études rapportent la SUMOylation de PTEN sur des lysines variées (K254, K266, K289) et observent que la SUMOylation de PTEN augmente son activité, diminuant ainsi la signalisation PI3K/AKT, par augmentation de sa stabilité (Wang et al., 2014), et en favorisant son association avec la membrane plasmique, où elle peut inhiber l'action de PI3K (González-Santamaría et al., 2012; Huang et al., 2012). Cependant, Bassi *et al.* ont observé que la SUMOylation de PTEN sur la lysine K254 n'avait aucun effet sur la signalisation PI3K/AKT, mais qu'elle servait un rôle méconnu de PTEN dans la réparation de dommage à l'ADN, non seulement en favorisant une localisation nucléaire de PTEN, mais aussi en participant activement aux fonctions de réparation (Bassi et al., 2013). Il est possible que la SUMOylation de différentes lysines donne lieu à des mécanismes différents.

Un autre exemple intéressant du rôle de la SUMOylation dans la régulation des programmes transcriptionnels potentiellement oncogénique vient de deux cribles par séquençages effectués chez des patients atteints de mélanomes et de cancer du rein. Une grande partie de ces cancers semble trouver son étiologie dans des causes environnementales telles que l'exposition aux ultraviolets pour le mélanome et le tabagisme ou l'obésité pour le cancer du rein. Cependant, une étude a montré l'existence d'une association de ces deux types de cancer au sein d'une population de patients, suggérant un mécanisme commun de prédisposition génétique. Les deux groupes identifient, par séquençage du génome entier ou par séquençage ciblé du gène *Mitf*, la mutation E318K, enrichie dans les patients présentant une des deux pathologies, ou les deux, par rapport à une population contrôle (Bertolotto et al., 2011; Yokoyama et al., 2011). De manière frappante, cette mutation se situe dans un site consensus de SUMOylation, et abolit la SUMOylation du facteur de transcription MITF. Les auteurs montrent que ce mutant possède une capacité de liaison et une activité transcriptionnelle accrue par rapport à la forme sauvage, sur une sous-catégorie de gènes cibles de MITF. De plus, une expérience de CHIP-seq (Immunoprécipitation de chromatine couplée à un séquençage haut débit) montre que le mutant possède un nombre de site de

liaison sur le génome plus de deux fois supérieur à celui de l'allèle sauvage. L'analyse transcriptomique d'une lignée cellulaire de cancer du rein (RCC4) surexprimant le mutant de MITF a révélé la surexpression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et l'inflammation, et une diminution de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. Les auteurs ont confirmé le potentiel oncogénique du mutant non-SUMOylable de MITF par des essais de transformation de lignées cellulaires, les cellules surexprimant le mutant présentant une croissance normale mais des capacités de migration, invasion et formation de colonies accrues. Ces résultats sont importants dans la mesure où ils décrivent une mutation affectant la SUMOylation d'un facteur de transcription chez l'Homme, avec des conséquences importantes sur la physiopathologie de deux cancers relativement répandus.

Enfin, la diminution globale de la SUMOylation peut affecter la survie de cellules transformées par l'oncogène Myc. Dans un crible ARN interférence recherchant des gènes de létalité synthétique avec l'oncogène Myc, Kessler *et al.* ont identifié l'enzyme E1 de SUMOylation, SAE1/2 (Kessler et al., 2012). Les auteurs observent que la diminution de l'expression de SAE1/2 dans des cellules présentant une hyperactivation de Myc conduit à une catastrophe mitotique et la mort des cellules, un phénotype rappelant celui de l'inactivation génétique d'*Ubc9* dans les embryons de souris (Nacerddine et al., 2005). Mécanistiquement, les auteurs identifient une sous-catégorie de gènes contrôlés par la SUMOylation et impliqués dans le fonctionnement du fuseau mitotique. De plus, une analyse de l'expression des transcrits de *Sae1/2* dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein et surexprimant Myc montre une augmentation du taux de survie sans métastase associée à une faible expression de *Sae1/2*.

La SUMOylation est donc associée à plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeurs, et sa modulation peut modifier les propriétés tumorales.

#### **e) Etude du rôle physiopathologique de la SUMOylation dans le cancer du côlon**

La dernière décennie a révélé un facteur important favorisant la tumorigenèse et la progression de pratiquement tous les cancers : l'infiltration de cellules immunitaires favorisant l'inflammation (Pagès et al., 2010). De très nombreuses études ont clairement impliqué l'inflammation dans la progression des néoplasies, en apportant aux cellules cancéreuses d'importants avantages. Les cellules immunitaires attirées par l'inflammation sécrètent des facteurs de croissances favorisant la croissance et la survie, tels que l'EGF par



exemple. Elles fournissent également des signaux pro-angiogénique comme le VEGF, et provoquent une vasodilatation favorisant la migration. Les protéases sécrétées au cours de l'inflammation, telles que les métalloprotéases ou les cathepsines dégradent la matrices extracellulaires, favorisant l'invasion ((Colotta et al., 2009; DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian and Pollard, 2010) pour revue). Etant donné le rôle joué par la SUMOylation dans l'inflammation, explicité dans l'introduction de ce manuscrit et étudié dans la partie « Résultats », il est envisageable que la SUMOylation module l'oncogenèse et la progression tumorale par son intermédiaire.

De plus, les travaux précédents du laboratoire ont démontré l'importance majeure de la SUMOylation dans l'homéostasie de l'intestin. En effet, en conséquence de la létalité embryonnaire de l'inactivation homozygote d'*Ubc9*, des sites loxP ont été introduits entre les exons 1 et 2, et les exons 3 et 4 du gène *Ubc9* chez la souris. Grâce à l'insertion d'un transgène *CreERT2* sous contrôle du locus ubiquitaire ROSA26, la recombinaison des sites loxP par le Cre-recombinase peut être obtenue en présence de 4-hydroxytamoxifène (4OHT). L'allèle d'*Ubc9* ainsi créé ne possède ni exon 2 ni exon 3 et est non-fonctionnel. L'injection répétée de 4-OHT aux souris de génotype *Ubc9<sup>fl/-</sup> /ROSA26-CreERT2* cause leur mort en six jours. Une forte diminution des profils de SUMOylation est observée dans tous les organes, cependant l'analyse histologique ne révèle aucun phénotype, à l'exception de l'intestin. En effet, les villi intestinaux sont raccourcis, les cellules des cryptes entrent en apoptose, les cellules souches LGR5+ disparaissent, et l'organisation générale des villi est perturbée. Ceci indique que l'intestin est le principal organe affecté lors de la perte de la SUMOylation (Demarque et al., 2011).

Or, l'intestin, et particulièrement le côlon, est organe pour lequel l'inflammation joue un rôle important dans l'oncogenèse. La totalité des cancers colorectaux présentent un infiltrat de cellules immunitaires (Atreya and Neurath, 2008). Les cellules immunitaires inflammatoires produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS « Reactive Oxygen Species »), causant des dommages à l'ADN dans les cellules adjacentes, et des cytokines, qui peuvent atteindre une grande portion du tissu adjacent et provoquer la synthèse de ROS par les cellules épithéliales, provoquant encore plus de dommage à l'ADN et favorisant les mutations (Meira et al., 2008; Westbrook et al., 2009). Les cytokines peuvent également favoriser la progression des tumeurs en augmentant l'angiogenèse et en tempérant l'immunité adaptative (Grivennikov et al., 2010). La voie NFkB, centrale dans l'inflammation, est activée

de manière aberrante dans plus de 50% des cancers colorectaux humains (Kojima et al., 2004). De plus, dans un modèle murin de cancer colorectal chimio-induit, l'injection d'azoxyméthane (AOM) provoque des mutations et l'apparition d'un faible nombre d'adénomes, un stade précoce de cancer colorectal, en environ six mois. L'induction d'une colite chronique par ingestion de DSS (Dextran Sulfate de Sodium) après une simple injection d'AOM augmente de manière drastique le nombre et la taille des adénomes formés, et la période d'apparition des adénomes est réduite à 10 semaines (Neufert et al., 2007). Ceci met en évidence le rôle prépondérant de l'inflammation à la fois dans l'initiation (augmentation du nombre d'adénomes) et la progression (augmentation de la taille et de la vitesse d'apparition) du cancer colorectal.

L'importance capitale de la SUMOylation dans les processus inflammatoire et dans l'homéostasie de l'intestin nous a donc engagés à évaluer le rôle de la SUMOylation dans l'oncogenèse et la progression tumorale, avec pour modèle *in vivo* le cancer du côlon chimio-induit chez la souris.

## IV. Objectifs généraux de la thèse

Les objectifs des travaux de thèse de thèse décrits ici ont été divisés en deux parties.

La première a consisté en la caractérisation à la fois quantitative et qualitative de la réponse inflammatoire de cellules myéloïdes en présence de PRR, avec une emphase sur les cellules dendritiques inflammatoires, composants clés de la réponse à des agressions pathogènes *in vivo*. Ceci a permis également d'observer les effets majeurs de la perte de SUMOylation dans le compartiment myéloïde sur la réponse au choc endotoxique *in vivo*, ainsi que sur la réponse antivirale. De plus, étant donnés les rôles multiples et parfois antagonistes décrits à ce jour pour la SUMOylation dans les événements moléculaires permettant la mise en place d'une réponse immunitaire innée, l'objectif final de ce projet a été d'identifier un mécanisme dominant ainsi que la résultante globale des multiples conséquences de la perte de la perte de SUMOylation au niveau moléculaire.

La seconde partie a consisté en l'évaluation des conséquences de la perte globale de SUMOylation dans le cancer, par le biais d'approches *in vitro* et *in vivo*. Des études de biologies cellulaires ont ainsi été mises en place pour caractériser ces conséquences sur les processus fondamentaux que sont le cycle cellulaire et la mitose, et plusieurs modèles *in vivo* chez la souris ont été utilisés pour évaluer l'importance de la SUMOylation dans le cancer du côlon. Enfin, des études transcriptionnelles et d'immunohistochimie menées sur une cohorte de patients atteints de cancer colorectal ont eu pour but de tester l'éventuel dérégulation de la SUMOylation.

# Résultats

# I. Caractérisation du rôle de la SUMOylation dans l'immunité innée

## A. Préambule

La SUMOylation joue un rôle essentiel dans la vie de la cellule, et sa perturbation aboutit à de graves conséquences à l'échelle de l'organisme, comme l'ont montrés les travaux précédents du laboratoire sur le développement embryonnaire et l'homéostasie intestinale. Des résultats préliminaires d'une étude transcriptomique effectuée sur des fibroblastes embryonnaires murins déficients pour *Ubc9* a révélé, entre autres, une signature correspondant à une réponse immunitaire. Les travaux d'autres groupes et du nôtre ont montré que la SUMOylation est fortement impliquée dans le contrôle de la réponse immunitaire innée. Ce contrôle s'exerce à la fois au niveau de la transduction des signaux de dangers, et au niveau du contrôle transcriptionnel, directement à la chromatine. Cependant, la majorité des études passées se sont concentrées sur un substrat unique, et ont été menées dans des conditions relativement éloignées de la réalité physiologique. En effet, beaucoup reposent sur des techniques de surexpression, la plupart du temps d'un mutant de la Lysine SUMOylable, qui peut avoir des fonctions non-liées à la SUMOylation. Enfin, ces travaux, bien que nécessaires et informatifs, ont apporté une certaine confusion, dans la mesure où la SUMOylation a été présentée alternativement comme activatrice ou répressive.

Nous avons donc proposé une approche différente de celle entreprise jusqu'à présent, en étudiant les conséquences de la diminution globale de la SUMOylation sur la réponse transcriptionnelle liée à l'immunité innée. Les modèles disponibles au laboratoire, et particulièrement le modèle murin de délétion inductible d'*Ubc9*, nous ont permis de caractériser ces conséquences, en dérivant des cellules myéloïdes déficientes pour *Ubc9*. La conséquence majeure que nous avons observée est une forte augmentation, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique, de la réponse immunitaire innée. Le gène majoritairement affecté par la diminution de la SUMOylation est le gène de l'interféron beta, *Ifnb1*. Nous avons pu montrer que l'augmentation de la production des autres cytokines est dépendante de ce dérèglement de la transcription d'*Ifnb1*. De plus, les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire innée sont inaltérées par la perte de SUMOylation. Nous proposons deux mécanismes pour l'augmentation de l'*Ifnb1*. Le premier est le contrôle à distance du gène par des régions régulatrices apparentées à des *enhancers* et qui sont liées

par SUMO. Le second est le déclenchement de la réponse ISD (Interferon Stimulating DNA), suite à la surexpression de séquences rétrovirales endogènes, elles aussi liée par SUMO au niveau du génome. Ces travaux permettent d'aborder la SUMOylation comme un véritable répresseur de la réponse immunitaire innée, et renforce le dogme de l'importance de SUMO à la chromatine.

## **B. Article**

## Sumoylation keeps in check the inflammatory and anti-viral gene expression programs

Adrien Decque<sup>1,2,3\*</sup>, Olivier Joffre<sup>4,5,X,\*</sup>, Joao G. Magalhaes<sup>4,5</sup>, Jack-Christophe Cossec<sup>1,2</sup>, Ronnie Blecher-Gonen<sup>6</sup>, Céline Keime<sup>7</sup>, Stéphanie Beaucourt<sup>8</sup>, Jacob Seeler<sup>1,2</sup>, Pierre Lapaquette<sup>1,2</sup>, Pierre-Emmanuel Joubert<sup>9</sup>, Matthew L. Albert<sup>9</sup>, Marco Vignuzzi<sup>8</sup>, Irwin Davidson<sup>7</sup>, Ido Amit<sup>6</sup>, Sebastian Amigorena<sup>4,5,‡</sup> and Anne Dejean<sup>1,2,‡</sup>

<sup>1</sup> Nuclear Organization and Oncogenesis Unit, Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

<sup>2</sup> INSERM, U993, F-75015 Paris, France

<sup>3</sup> Univ. Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, F-75015 Paris, France

<sup>4</sup> Centre de Recherche, Institut Curie, 75005 Paris, France

<sup>5</sup> INSERM, U932, F-75005 Paris, France

<sup>6</sup> Department of Immunology, Weizmann Institute, Rehovot 76100, Israel

<sup>7</sup> Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/UDS, 67404 Illkirch Cedex, France

<sup>8</sup> Viral Populations and Pathogenesis Unit, Institut Pasteur, CNRS UMR 3569, F-75015 Paris, France

<sup>9</sup> Laboratory of Dendritic Cell Immunobiology, Institut Pasteur, INSERM U818, F-75015 Paris, France

<sup>X</sup> Present address : INSERM CPTP U1053, CHU Purpan, 31300 Toulouse, France

\*These authors contributed equally to this work

‡ Correspondence: sebastian.amigorena@curie.fr (S.A.), anne.dejean@pasteur.fr (A.D.)

Running Title: SUMO negatively controls inflammation

Key words: SUMO, inflammation, anti-viral response, *IFN-β* gene, enhancers, eRNAs

## ABSTRACT

Production of type I interferons (IFN-I) and other inflammatory cytokines is a crucial innate immune mechanism against invading microorganisms. However, under normal conditions and pathogen infection, immune responses must be tightly regulated since they can be deleterious to the host if misregulated. Importantly, IFN-I expression is subject to negative regulation but the underlying mechanisms remain largely unknown. Here we show that sumoylation plays a crucial role in negatively regulating innate immune transcriptional programs. Dendritic cells deficient for the unique SUMO E2 enzyme Ubc9 showed enhanced induction of the pro-inflammatory response. Most importantly, sumoylation deficiency triggered a potent spontaneous IFN-I response and dramatically increased the induced anti-viral program. Accordingly, reduced sumoylation confers susceptibility to endotoxic shock and renders cells more resistant to viral infection. IFN- $\beta$  acts as the master regulator of the SUMO-dependent inflammatory and anti-viral transcriptional signatures. Mechanistically, SUMO dynamically occupies distant *cis*-regulatory elements of the *Ifnb1* gene and impairment of sumoylation turns the *Ifnb1* promoter into a primed/active epigenetic state. Moreover, Ubc9 depletion leads to derepression of SUMO-marked VL30-class of endogenous retroviruses (ERVs), correlating with activation of the interferon response. Together this suggests that both *cis*- and *trans*-regulatory mechanisms account for SUMO-dependent repression of *Ifnb1* gene transcription. These findings identify sumoylation as a key process regulating immune homeostasis and suggest that compounds targeting sumoylation may serve as a new generation of immunomodulatory drugs.



## INTRODUCTION

During infections, mammals mount inflammatory innate responses intended to contain and eliminate pathogenic microorganisms. Innate immune responses are initiated by signals from pattern recognition receptors (PRRs), including toll-like receptors (TLRs) and other families of innate sensors. These sensors recognize evolutionary conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), as well as host-derived danger molecules released by stressed or dying cells. Signaling by PRR induces the expression of innate response genes, including those encoding pro-inflammatory cytokines and chemokines (Mogensen, 2009). While largely beneficial to the host, inflammatory responses need to be qualitatively and quantitatively regulated, as excessive or prolonged exposure of tissues and organs to inflammatory mediators can indeed result in severe damage and dysfunction. Indeed, several cell-intrinsic and -extrinsic regulatory mechanisms to finely tune inflammatory responses have been described (Cook et al., 2004).

Among inflammatory mediators, type I interferons (IFN-I) play a critical role in anti-viral responses and in several pathological conditions (Gough et al., 2012). IFN-I are constitutively produced at very low levels at steady state. Basal IFN-I production critically regulates several biological processes, including hematopoietic stem cell niches and different immune cell functions (Essers et al., 2009). The molecular mechanisms that regulate basal IFN-I production are largely unknown. In the absence of innate stimuli, c-Jun and NF $\kappa$ B component p65 promote constitutive *Ifnb* gene expression, whereas NF $\kappa$ B p50 homodimers and IRF-2 function as attenuators of *Ifnb* transcription (Gough et al., 2012). However, the level of IFN- $\beta$  upon loss of p50 has not been measured, and whereas some IFN-inducible genes are up-regulated in *Irf2*<sup>-/-</sup> mice, the level of *Ifnb* transcripts is similar compared to that in their wild-type littermates (Hida et al., 2000). These results indicate that additional negative regulatory pathways of constitutive IFN- $\beta$  production remain to be identified. In contrast, pathogen-induced expression of the *Ifnb* gene is one of the best-characterized models of inducible gene expression. Induction of the *Ifnb* gene requires the recruitment of the transcription factors ATF-2/c-Jun, IRF-3 and IRF-7, and NF $\kappa$ B (p50/p65). These activators bind the *Ifnb* promoter in a cooperative fashion and form a stable complex called the enhanceosome (Thanos and Maniatis, 1995). Once secreted, IFN- $\beta$  binds to its receptor and activates the canonical JAK-STAT pathway, leading to the induction of IFN-stimulated genes (ISGs) that contribute to pathogen restriction.

Induced IFN-I, when inappropriately regulated, actively participates to pathogenesis of several autoimmune diseases (Gough et al., 2012). Systemic lupus erythematosus (SLE) patients display high levels of IFN-I in the acute phase of the disease, and IFN-neutralizing antibodies have proved to be beneficial in clinical trials. In Aicardi-Goutières syndrome (AGS) patients, mutations in the gene encoding Trex1, a 3'→5' DNA exonuclease, result in excessive production of IFN-I consecutive to the cytosolic accumulation of self-nucleic acids (NAs) (Crow et al., 2006). Though the precise nature of the ligand activating the IFN-I pathway in this context is still a matter of debate, it was shown that Trex1 deficiency leads to the accumulation of single-stranded DNA generated from replication intermediates (Yang et al., 2007) or from endogenous retroelements (Stetson et al., 2008). During different viral and bacterial infections, over production of IFN-I can cause overt inflammation and be the primary cause of organ failure. For example, IFN-I is critically involved in the septic shock that develops after systemic exposure to LPS in mouse models (Karaghiosoff et al., 2003). Although the production of suppressive cytokines, such as TGF- $\beta$  or IL-10, is involved in the resorption of inflammation, the actual molecular mechanisms that negatively control both basal and induced IFN-I gene expression remain largely unknown.

The post-translational modification by SUMO critically regulates protein functions, through altering protein stability, localization, interactions or activities (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007; Hay, 2005). Higher eukaryotes have three SUMO paralogs, SUMO-1, -2, and -3, the latter two being almost identical (referred to as SUMO-2/3). Whereas most of SUMO-1 is conjugated to its substrates, SUMO-2/3 is highly sensitive to stress and can form long polymeric chains. Similar to ubiquitination, sumoylation is catalyzed by a specific cascade composed of E1 (Aos1/Uba2), E2 (Ubc9) and E3 enzymes. Sumoylated proteins go through constant cycles of conjugation/deconjugation due to various desumoylases and perturbation of this balance contributes to the development and progression of several diseases.

Among possible molecular mechanisms of control, sumoylation is emerging as an important process regulating innate immunity (Everett et al., 2013; Shuai and Liu, 2005). The PIAS SUMO-specific E3 ligases negatively control the activity of critical transcription factors regulating inflammation, such as STATs and NF- $\kappa$ B. These E3 ligases repress transcription by two basic types of mechanisms. In the first, or direct mechanism, PIAS blocks the binding of NF $\kappa$ B or STAT proteins to their binding sites in a process that appears to be independent of its E3 ligase activity (Liu et al., 2004, 2005). In the second, or transrepression mechanism, PIAS (or HDAC4) proteins mediate the sumoylation of ligand-bound nuclear receptors, such

as PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha/\beta$  (Glass and Saijo, 2010; Lee et al., 2009) inhibiting clearance of repressor complexes from the promoter or preventing binding of transcriptional activators. In addition, SUMO exerts inhibitory effects through direct modification of key immune regulators including IRFs (Kubota et al., 2008; Liang et al., 2011), NF- $\kappa$ B (Liu/ref103 Everett), I $\kappa$ B $\alpha$  (Desterro et al., 1998) or AP-1 (Tempé et al., 2014). By contrast to the above examples in which sumoylation restrains innate immune signaling, SUMO has also been associated with enhancement of anti-viral pathways. Notably, sumoylation of the cytosolic receptors for viral RNA RIG-I and MDA5 (Fu et al., 2011; Mi et al., 2010) as well as depletion of the SENP2 desumoylase increases activation of the *Ifnb1* promoter (Ran et al., 2011).

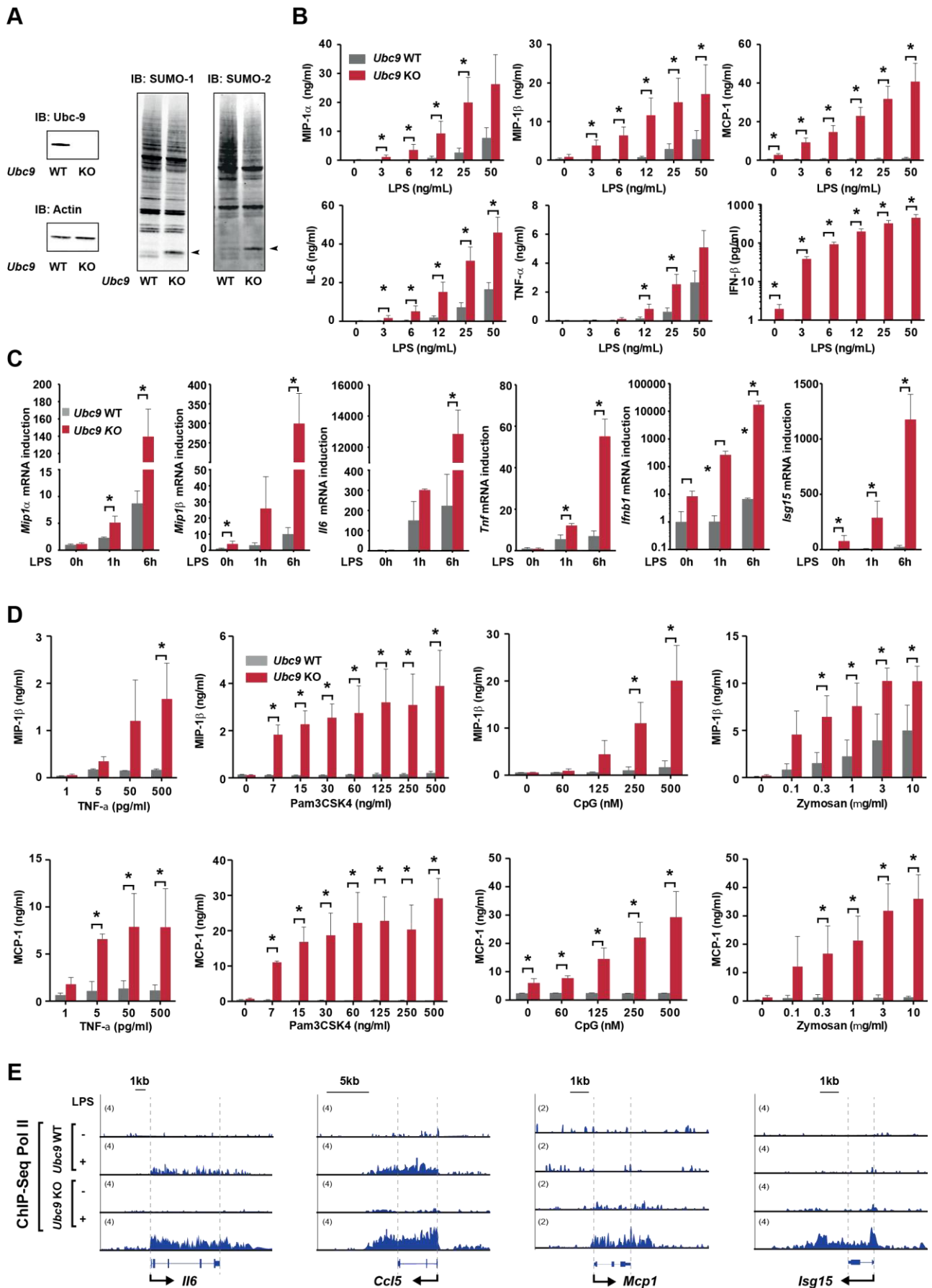
Given the large number of SUMO substrates involved in the multiple signaling pathways underlying innate immunity, it is thus not surprising that, depending on the substrate, sumoylation appears to play either enhancing or suppressive functions. In the present study, we have analyzed the functional consequence of globally decreasing the cellular levels of sumoylation after the induced depletion of Ubc9. The most important consequence of reduced sumoylation was a marked increase in the basal production of IFN-I and a strong, IFN-I receptor-dependent, enhancement of inflammatory cytokine production upon TLR-engagement. Increased IFN-I production in Ubc9-deficient cells was due to both direct regulation of IFN- $\beta$  gene expression and to the de-repression of VL30-class of endogenous retroviruses (ERVs). These results show a coordinated role for sumoylation in the negative control of basal and induced production of IFN-I. They also identify a direct link between the IFN-I responses and the production of inflammatory cytokines during innate immune responses.

## RESULTS

### Sumoylation is a negative regulator of the inflammatory response

Dendritic cells (DCs) play a critical role in both innate and adaptive responses to pathogens. In order to analyze the role of sumoylation in dendritic cell functions, bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were differentiated from *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* and *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* (Demarque et al., 2011) and treated with 4-hydroxytamoxifen. In mutant cells, the Ubc9 protein was undetectable leading to the appearance of free SUMO-1 and -2, concomitant with a reduction in global protein-associated sumoylation levels (Fig 1A).

We first analyzed the impact of Ubc9-deficiency on the inflammatory response mediated by BMDCs upon stimulation with a TLR4 agonist, LPS. Impaired sumoylation did not quantitatively affect BMDC differentiation or survival, but it modestly enhanced their spontaneous maturation, as measured by the expression of different maturation markers (Sup Fig S1A). When compared to their wild-type (Ubc9 WT) counterparts, Ubc9-deficient (Ubc9 KO) BMDCs responded to lower concentration of LPS and secreted higher amount of key pro-inflammatory mediators including MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , at saturating concentration of LPS (Fig 1B). Similar enhanced inflammatory response was observed at the transcript levels upon Ubc9 loss, as detected by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) (Fig 1C). Moreover, exacerbated inflammatory response was also observed when endogenous danger signals (e.g. TNF- $\alpha$ ) or other PRR agonists (e.g. Pam3CSK4, CpG or Zymosan) were used as stimuli (Fig 1D), and when Ubc9-deficient Flt3L-induced BMDCs (Fig S1B) or bone marrow-derived macrophages (Fig S1C) were used as responder cells. RNA polymerase II (Pol II) chromatin immunoprecipitation/DNA sequencing (ChIP-Seq) analysis in Ubc9 WT *versus* KO BMDCs stimulated with LPS for 2h revealed enhanced Pol II recruitment at the promoter and throughout the gene of LPS-induced genes, including *Il6*, *Ccl5*, *Mcp1* and *Isg15* in the mutant cells (Fig 1E). These results show that decreased sumoylation in Ubc9 KO cells causes exacerbated transcription of different inflammatory cytokine genes in response to different innate stimuli, suggesting that high sumoylation represses inflammatory cell responses in wild-type cells.



**Figure 1: Sumoylation deficiency activates the pro-inflammatory response.**

**A-** Ubc9 protein level and global SUMO-1/-2 patterns in *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* (WT) and *Ubc9<sup>0/0</sup>/T2* (KO) GM-CSF-induced BMDCs treated with 4-hydroxytamoxifen for 4 days. The arrowhead indicates free SUMO. Actin was used as a control.

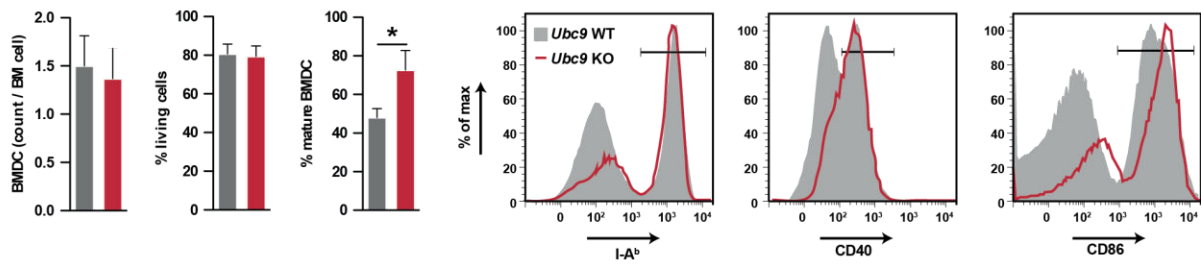
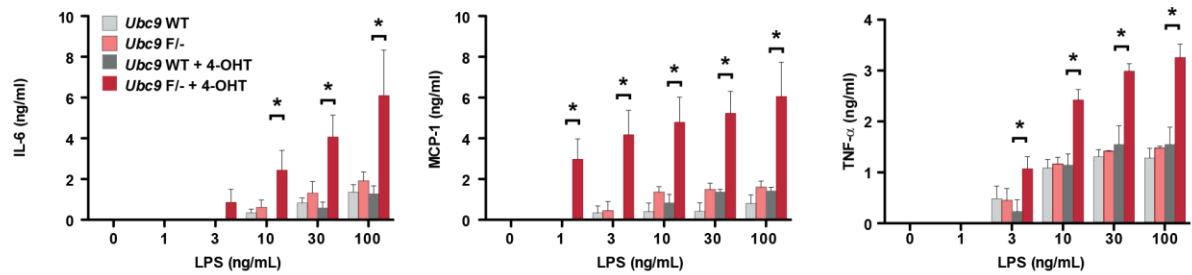
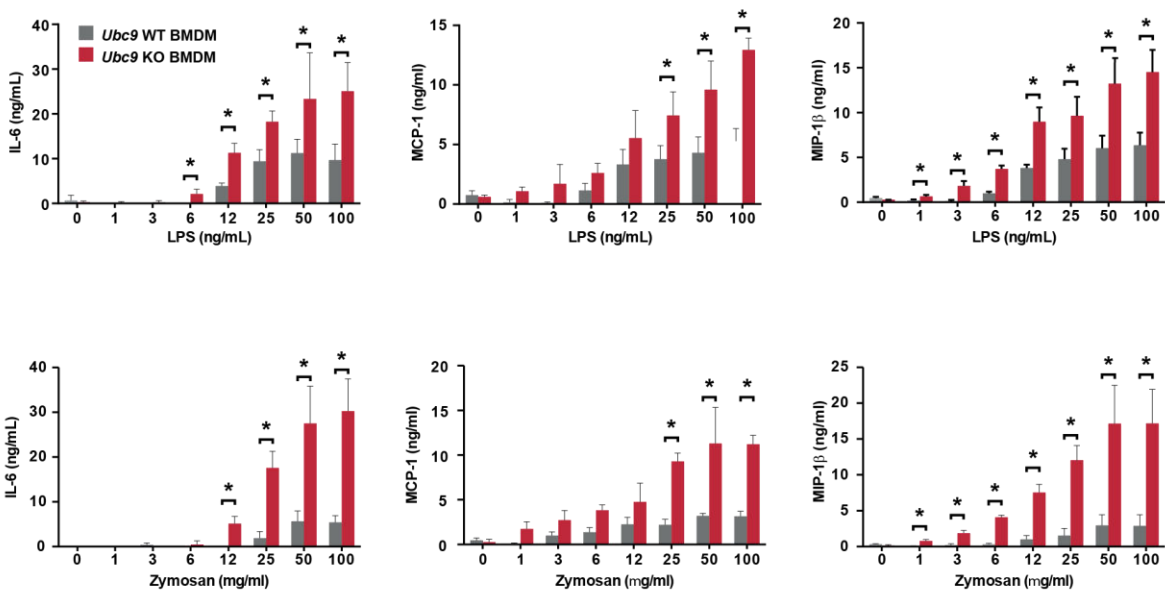
**B-** Production of pro-inflammatory cytokines by Ubc9 WT or KO BMDCs stimulated for 20h with increasing doses of LPS as determined by ELISA (IFN- $\beta$ ) or by flow cytometry using bead-based multiple analytes detection system.

**C-** Cytokine and ISG15 mRNA levels in Ubc9 WT or KO BMDCs activated for 0, 1 or 6h with LPS (10ng/ml) as determined by RT-qPCR.

**D-** Pro-inflammatory cytokine production by Ubc9 WT or KO BMDCs stimulated for 20h with an endogenous danger signal (TNF- $\alpha$ ) or various PRR agonists (Pam3CSK4, CpG and Zymosan) as determined by flow cytometry using bead-based multiple analytes detection system.

**B-D-** Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p$  <0.05 (Mann-Whitney test).

**E-** Representative Integrative Genomics Viewer (IGV) screenshots showing Pol II ChIP-Seq data at the *IL6*, *Ccl5*, *Mcp1* and *Isg15* loci in Ubc9 WT and KO BMDCs stimulated with LPS for 0 and 2h.

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

### Figure S1: Cytokine production in *Ubc9* WT and KO cells.

**A-** Frequency, viability and maturation status of *Ubc9* WT and KO GM-CSF-induced BMDCs. DCs were differentiated from *Ubc9*<sup>+/+</sup>/T2 (WT) and *Ubc9*<sup>fl/-</sup>/T2 (KO) hematopoietic precursors and treated with 4-hydroxytamoxifen. At the end of the culture, their number and viability were determined on a Cellometer Auto 2000 cell counter after staining with acridin orange and propidium iodide. Their expression of MHC class II molecules (I-A<sup>b</sup>) and maturation markers (CD40 and CD86) was also analysed by flow cytometry. The frequency of mature DCs, defined as CD11c<sup>+</sup> I-A<sup>b</sup><sup>high</sup> CD40<sup>high</sup> CD86<sup>high</sup>, as well as representative histograms are shown.

**B-** Flt3L-induced BMDCs were differentiated from *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* (WT) and *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* (F/-) hematopoietic precursors, treated or not with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), and stimulated with increasing doses of LPS. Pro-inflammatory cytokine production by BMDCs was determined 20h later by flow cytometry using bead-based multiple analytes detection system.

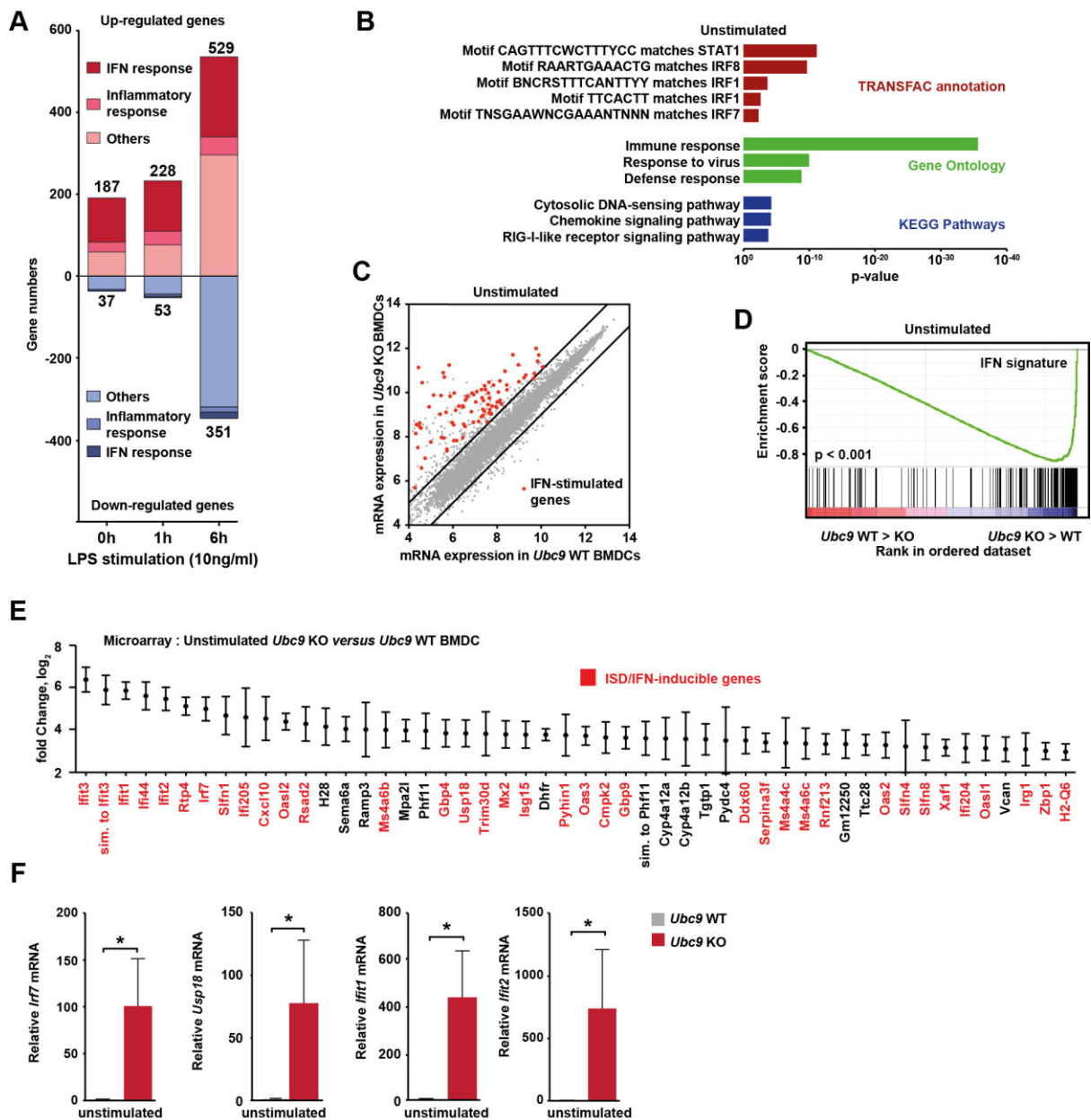
**C-** BMDMs were differentiated from *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* (WT) and *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* (KO) hematopoietic precursors in the presence of M-CSF, treated with 4-hydroxytamoxifen for 4 days and stimulated with increasing doses of LPS or Zymosan. Pro-inflammatory cytokine production by BMDMs was determined 20h later by flow cytometry using bead-based multiple analytes detection system.

**A-C-** Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p < 0.05$ .



## Sumoylation deficiency triggers a spontaneous anti-viral transcriptional response

Detectable amounts of MCP-1 and IFN- $\beta$ , as well as increased levels of the *Ifnb1* transcript and its downstream target *Isg15*, were also observed in mutant BMDCs in the absence of stimulation (Fig 1B,C). To identify the global gene-expression program induced by sumoylation deficiency in the absence of stimulation, we performed a microarray analysis of Ubc9 KO and WT BMDCs. We detected increased transcription of 187 genes in mutant cells when compared to their wild-type counterparts, whereas 37 genes were down-regulated (Fig 2A and Table S1). Ontology analysis revealed that genes associated with the anti-viral response, notably with cytosolic DNA and RNA sensing pathways, were by far the most strongly enriched among up-regulated genes with a large set (108/187) of genes corresponding to ISGs (Fig 2B,C). Down-regulated genes were enriched for regulators of lipid biosynthesis, a feature previously observed during the IFN response (Blanc et al., 2011) (Fig S2). The over-representation of IFN transcriptional signature genes in unstimulated Ubc9 KO BMDCs was further confirmed by gene-set enrichment analysis (Fig 2D). Remarkably, ISGs comprised over 70% of the top 50 genes with increased expression in sumoylation-defective cells (Fig 2E). Of particular interest was *Irf7*, a gene which plays a critical role in the establishment of immune responses (Honda et al., 2005) and was increased ~100-fold in Ubc9 KO cells. The strong induction of these ISGs under normal conditions was validated by RT-qPCR (Fig 2F). These results indicate that reduced sumoylation is sufficient to initiate spontaneous IFN-I production, indicating that high sumoylation is required to suppress basal IFN-I production at steady state.



**Figure 2: Sumoylation keeps in check the basal anti-viral response.**

**A-** Microarray analysis of mRNA expression in *Ubc9* KO vs WT BMDCs unstimulated and stimulated for 1 and 6h with LPS (fold change  $\geq 2$ - or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni). Dark red/blue indicates viral and IFN-regulated genes as determined using the interferome data base (<http://interferome.org/>), medium red /blue indicates the inflammatory response as determined by genes differentially expressed in LPS-treated vs untreated WT BMDCs excluding IFN-regulated genes, and light red/blue indicates other genes.

**B-** Functional annotation of up-regulated genes in unstimulated *Ubc9* KO vs WT BMDCs. The top over-represented categories belonging to 3 different ontologies are shown.

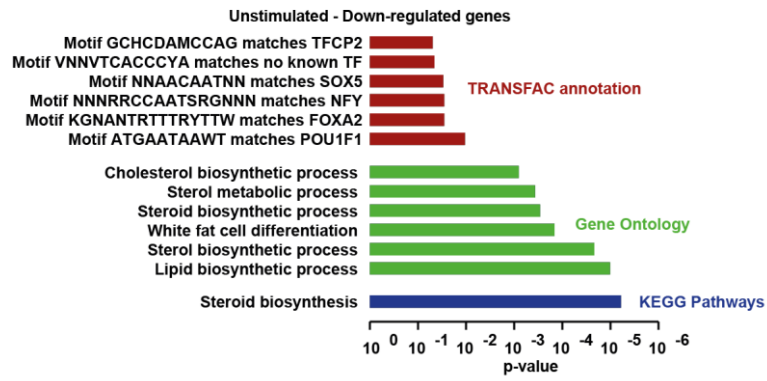
**C-** Scatter-plot comparing global gene expression profiles in unstimulated *Ubc9* KO vs WT BMDCs. The black lines indicate a two-fold-cut-off for the difference in gene expression levels. mRNA expression levels are on a log<sub>2</sub> scale. Data represent the average of 3 independent experiments.

**D-** Gene-set enrichment analysis (GSEA) demonstrates the over-representation of IFN-stimulated genes in unstimulated *Ubc9* KO BMDCs. Genes are ranked into an ordered list on the basis of relative

expression in Ubc9 KO vs WT BMDCs. The plot shows the distribution of the genes in the IFN transcriptional signature gene set against the ranked list of the genes. Data represent the average of 3 independent experiments.

**E-** Gene expression analysis of Ubc9 WT vs KO BMDCs. The top 50 genes are indicated. Data are represented in  $\log_2$  format and represent means  $\pm$ SD. n=3.

**F-** ISG mRNA levels in unstimulated Ubc9 WT and KO BMDCs as determined by RT-qPCR. Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p < 0.05$ .



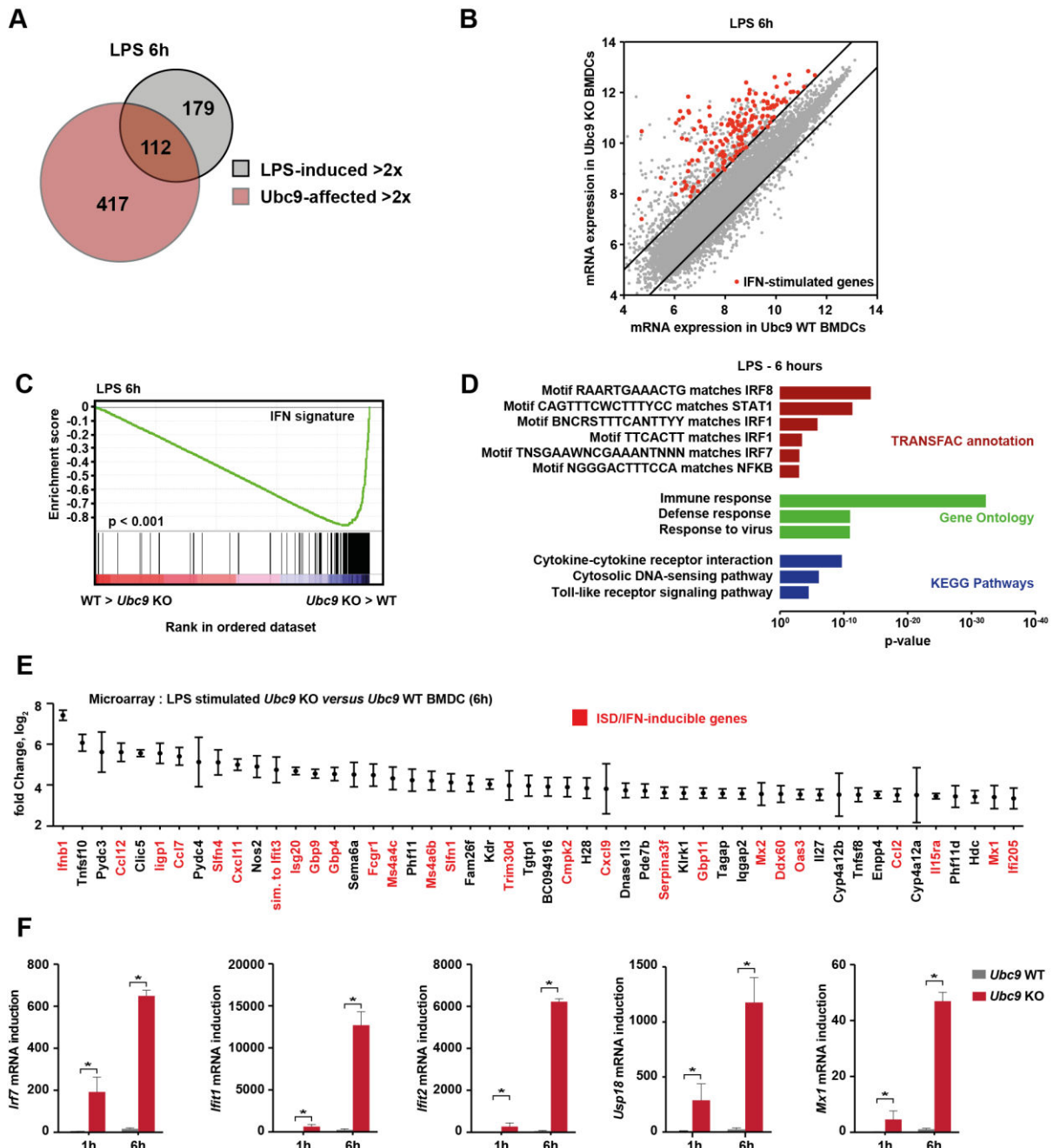
**Figure S2: Down-regulated genes in Ubc9 KO BMDCs are enriched for regulators of lipid metabolism.**

Functional annotation of down-regulated genes in unstimulated Ubc9 KO vs WT BMDCs. The top over-represented categories belonging to 3 different ontologies are shown.

## Sumoylation is a negative regulator of the induced anti-viral response

Microarray analysis of Ubc9 KO BMDCs stimulated with LPS for 1h or 6h revealed that 228 and 529 genes were induced at least two-fold when compared to wild-type cells (Fig 2A, Tables S2 and S3). Loss of Ubc9 resulted in the up-regulation of 35% and 38% of the LPS-inducible genes at 1 and 6h respectively, indicating that impairment of sumoylation largely affects the inflammatory gene response (Fig 3A and Fig S3A). In addition, impairment of sumoylation dramatically increased the levels of the ISGs found to be induced upon basal conditions and revealed expression of a number of additional ISGs (Fig 2A, Fig 3B,C and Fig S3B,C). Consistently, the most represented ontology terms in LPS-treated Ubc9 KO *versus* WT cells were 'immune response' and 'response to virus', which consist mostly of ISGs (Fig 3D). Remarkably, *Ifnb1* itself was massively induced in LPS-stimulated Ubc9 KO BMDCs and appeared as the top up-regulated gene after 6h LPS when compared to control cells (Fig 3E), in accordance with the ~2500-fold super-induction as detected by RT-qPCR (Fig 1C). Other key players of the IFN signaling, such as *Mx1* and *Mx2* (Haller et al., 2007), figured among the top 50 genes with increased expression in sumoylation-defective cells (Fig 3E). The enhanced anti-viral response triggered by LPS was confirmed by RT-qPCR (Fig 3F). These data indicate that loss of sumoylation triggers a major IFN- $\beta$  response in response to TLR-4 signaling.

To assess whether the obtained findings were transposable to other systems, we examined the effect of impaired sumoylation on innate immune response in two other cell types following TLR4 stimulation. Ubc9 KO murine embryonic fibroblasts (MEFs) cultured with or without the Gram-negative bacterium *Shigella flexneri* showed both a spontaneous IFN response and increased levels of anti-viral and pro-inflammatory gene transcripts in response to bacterial infection when compared to Ubc9 WT MEFs (Fig S3D). Similarly, stable shRNA-mediated knockdown of Ubc9 in the human monocytic cell line THP1 led to increased induction of anti-viral and inflammatory gene expression (Fig S3E). We conclude that reduced sumoylation triggers a major interferon response following innate signaling in different cell types and organisms.



**Figure 3: Sumoylation deficiency enhances the anti-viral transcriptional program.**

**A-** Venn diagram representing overlap between LPS-inducible genes in Ubc9 WT BMDCs (>2-fold, grey circles) and genes that were up-regulated in Ubc9 KO BMDCs at 6h after LPS treatment when compared to Ubc9 WT cells (>2-fold, red circles).

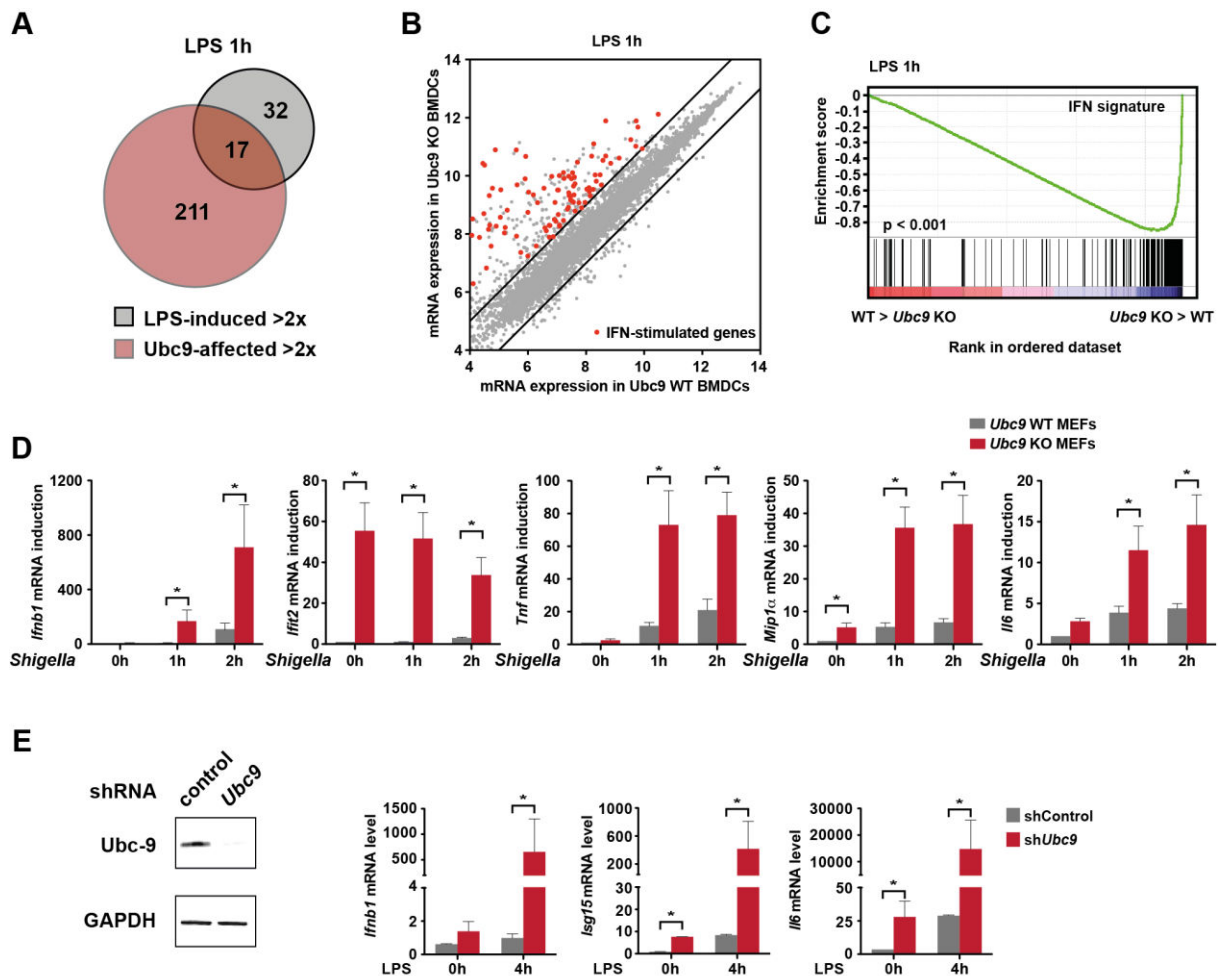
**B-** Scatter-plot comparing global gene expression profiles in Ubc9 KO vs WT BMDCs stimulated for 6h by LPS. The analysis was performed as in Fig 2C.

**C-** GSEA analysis demonstrates up-regulation of IFN-stimulated genes in Ubc9 KO BMDCs stimulated for 6h by LPS. The analysis was performed as in Fig 2D.

**D-** Functional annotation of up-regulated genes in Ubc9 KO vs WT BMDCs stimulated for 6h by LPS. The top over-represented categories belonging to 3 different ontologies are shown.

**E-** Gene expression analysis of Ubc9 WT vs KO BMDCs 6h post-stimulation with LPS. The top 50 genes are indicated. Data are represented in  $\log_2$  format and represent means  $\pm$ SD. n=3.

**F-** ISG mRNA levels in Ubc9 WT and KO BMDCs 1 and 6h post-stimulation with LPS as determined by RT-qPCR. Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p$  <0.05.



**Figure S3: Effect of Ubc9 loss on the pro-inflammatory and anti-viral transcriptional response in BMDCs, MEFs and THP1 cells**

**A-** Venn diagram representing overlap between LPS-inducible genes in Ubc9 WT BMDCs (>2-fold, grey circles) and genes that were up-regulated in Ubc9 KO BMDCs at 1h after LPS treatment when compared to Ubc9 WT cells (>2-fold, red circles).

**B-** Scatter-plot comparing global gene expression profiles in Ubc9 KO vs WT BMDCs at 1h after LPS treatment. The black lines indicate a two-fold-cut-off for the difference in gene expression levels. mRNA expression levels are on a log<sub>2</sub> scale. Data represent the average of 3 independent experiments.

**C-** Gene-set enrichment analysis (GSEA) demonstrates the over-representation of IFN-stimulated genes in Ubc9 KO BMDCs at 1h after LPS treatment. Genes are ranked into an ordered list on the basis of relative expression in Ubc9 KO vs WT BMDCs. The plot shows the distribution of the genes in the IFN transcriptional signature gene set against the ranked list of the genes. Data represent the average of 3 independent experiments.

**D-** Ubc9 WT and Ubc9 KO MEFs were infected for the indicated times by *Shigella flexneri* and *Ifnb*, *Ifit2*, *Tnf*, *Mip1α* and *Il6* transcripts were measured. Mean ±SD; \**p* <0.05, n=3.

**E-** Left panel: Immunoblot analysis of the knockdown efficiency of scrambled control shRNA or shRNA targeting Ubc9 mRNA in THP1 cells. Right panel: Ubc9-deficient or control THP1 cells were treated for 0h and 4h with LPS and *Ifnb*, *Isg15* and *Il6* transcripts were measured by RT-qPCR. Mean ±SD; \**p* <0.05, n=3.

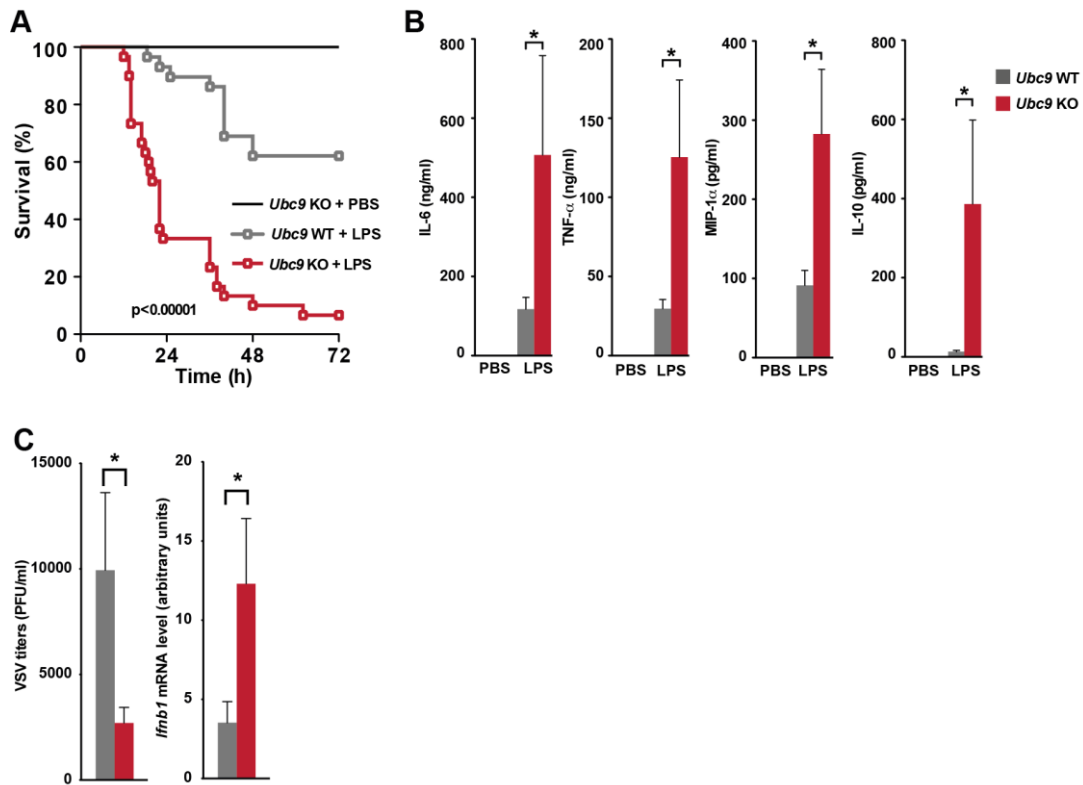


## **Impaired sumoylation confers hypersensitivity to endotoxin shock *in vivo* and increased resistance to viral infection *in vitro***

In order to investigate the functional relevance of reducing sumoylation in inflammatory responses *in vivo*, we next used an endotoxin shock model. To circumvent the early embryonic lethality inherent to lack of Ubc9 (Nacerddine et al., 2005), we generated bone marrow chimeras by transplanting *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* or control *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* bone marrow into lethally irradiated wild-type mice. Treatment with 4-hydroxytamoxifen did not affect survival of the chimeric *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* or control mice (Fig 4A). When challenged with LPS, mice restored with Ubc9-deficient hematopoietic cells showed hypersensitivity to LPS-induced endotoxin shock when compared to control mice (Fig. 4A). At day 3 after LPS injection, 60% of the control mice survived the LPS challenge, while only 5% of the mutant mice remained viable. This enhanced susceptibility to LPS correlated with increased levels of pro- (IL-6, TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the serum (Fig 4B).

Therefore, reduced sumoylation in hematopoietic cells causes increased death upon endotoxin shock, most likely due to an increased inflammatory response.

To address the role of sumoylation in protection of BMDCs to virus infection, we challenged Ubc9 KO and WT BMDCs with vesicular stomatitis virus (VSV). Compared to control cells, Ubc9-deficient cells exhibited a decrease in VSV titers by plaque assay (Fig 4C, left), concomitant with enhanced *Ifnb1* mRNA levels (Fig 4C, right). These results support the idea of the repressive function of sumoylation in innate immunity against viral infection by dampening IFN- $\beta$  production.



**Figure 4: Impaired sumoylation increases susceptibility to endotoxic shock and resistance to VSV infection.**

**A-** Age- and sex-matched *Ubc9*<sup>+/+</sup>/*T2* (WT) or *Ubc9*<sup>fl/-</sup>/*T2* (KO) hematopoietic chimeric mice were treated with 4-hydroxytamoxifen for 4 days and injected *i.p.* with PBS or LPS. Survival rates were scored every 8h for 3 days;  $p < 0.00001$  (log-rank), (n=16 per group).

**B-** Serum titers of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 and MIP-1 $\alpha$  was measured by flow cytometry using bead-based assays 6h after *i.p.* injection of LPS; Mean  $\pm$ SD; \* $p < 0.05$ , (n=8 per group).

**C-** Left panel: VSV was titered on *Ubc9* WT and KO BMDCs by plaque assay 24h post-infection. BMDCs were infected for 1h at a multiplicity of infection (m.o.i) of 10. Right panel: RT-qPCR analysis of *Ifnb* induction in *Ubc9* WT and KO BMDCs infected by VSV, assessed 6h after infection at a m.o.i of 10. Mean  $\pm$ SD; \* $p < 0.05$ , (n=5 per group).

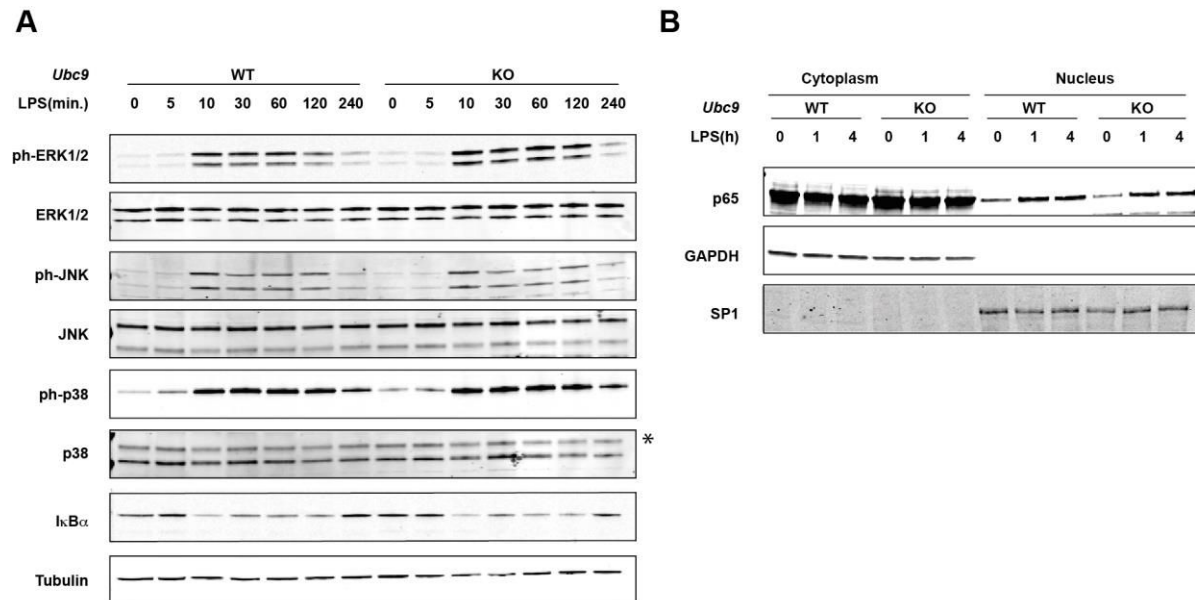
## Sumoylation-dependent inflammatory response requires the IFN-I receptor signaling

In order to investigate the mechanism of the observed effects, we first analyzed the consequences of decreased sumoylation on TLR4-induced signaling. Activation of the MAPK and NF $\kappa$ B pathways, as detected through the activation of ERK, JNK and p38 by LPS, was not demonstrably different in Ubc9-deficient BMDCs as compared to control cells (Fig S4A). Similarly, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and p65 (RelA) nuclear translocation, were not affected (Fig S4A,B). We conclude that increased TLR4 signaling does not explain the increased inflammatory response in sumoylation-deficient cells.

In order to investigate the contribution of the IFN-I receptor expression in the immune response regulated by sumoylation, we compared the gene expression response triggered by loss of Ubc9 in unstimulated and LPS-stimulated IFN- $\alpha$  receptor 1 (IFNAR1) KO *versus* control BMDCs. The spontaneous induction of *Ifnb* mRNA was almost entirely abrogated in Ubc9/ IFNAR1 DKO cells when compared to Ubc9 KO cells (Fig 5A) and the production of the IFN- $\beta$  protein was markedly reduced (Fig 5B). This observation is consistent with the existence of a positive feed-back loop regulating the transcription of the *Ifnb1* gene in dendritic cells (Honda et al., 2005), a process mediated by IRF-7 which we found significantly induced under basal conditions in Ubc9 KO cells (Fig 2E).

As expected, the super-induction of IFN- $\beta$  mRNA and protein upon LPS treatment was unaffected in Ubc9/ IFNAR1 DKO cells when compared to Ubc9 KO cells (Fig 5A,B), indicating that IFNAR1-mediated signaling is dispensable for the induction of IFN-I in Ubc9-defective cells. As expected too, the induction of the IFN-I response genes *Mxl1*, *Mcp1*, *Cxcl10* and *Isg15* and protein was abrogated or severely reduced in Ubc9 KO DCs (Fig 5A,B), while the LPS-induced transcription of NF $\kappa$ B-target genes such as *Il6*, *Mip1 $\alpha$* , *Ccl5* and *Nos2* was not altered in IFNAR1 KO cells as compared to their wild-type counterparts (Fig 5C). By contrast, the enhanced induction of the IL-6 mRNA (Fig 5C) and protein (Fig 5B) triggered by reduced sumoylation was impaired by over 80% in Ubc9/ IFNAR1 DKO cells down to the normal induction level as observed in wild-type cells. Increased induction of the inflammatory genes *Mip1 $\alpha$* , *Ccl5* and *Nos2* also showed IFNAR1-dependance upon Ubc9 loss (Fig 5C). Therefore, while the induction of inflammatory cytokines by LPS is IFNAR1-independent in WT cells, the increased inflammatory response in Ubc9-defective cells is IFNAR1-dependent. These results show that IFN-I plays a critical role in the effect of reduced

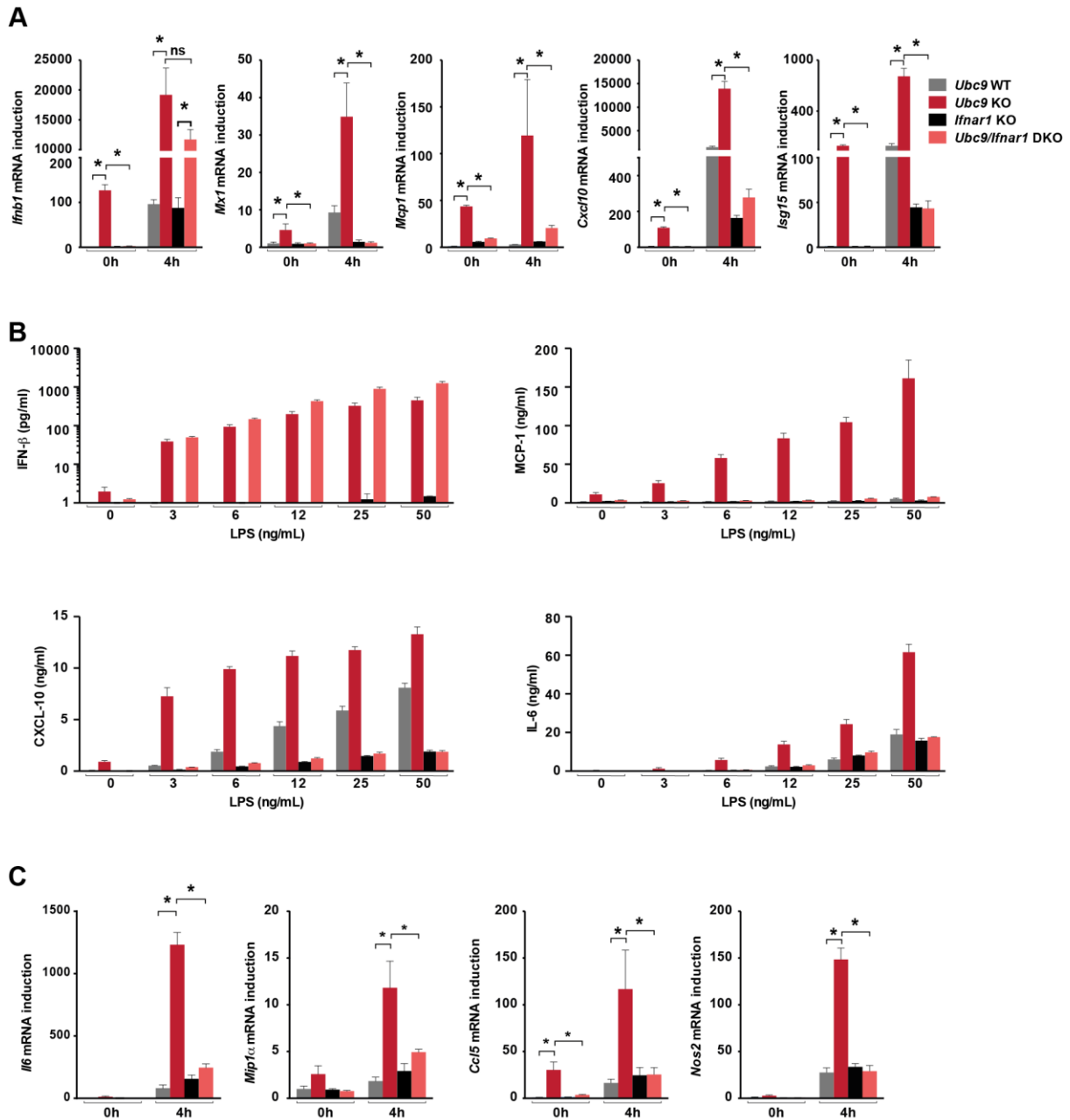
sumoylation on the induction of inflammatory cytokines by innate sensing, and suggest that the *IFN- $\beta$*  gene is the primary target of reduced sumoylation in the mutant cells.



**Figure S4: Impairment of sumoylation does not increase TLR4 signaling.**

**A-** Whole cell extracts from Ubc9 WT and KO BMDCs treated with LPS for the indicated times were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control.

**B-** Cytoplasmic and nuclear fractions from Ubc9 WT and KO BMDCs treated with LPS for the indicated times were analyzed by Western blotting using anti-p65 antibodies.



**Figure 5: IFNAR1 is required for the LPS-induced immune response triggered by loss of Ubc9.**

**A-** IFN- $\beta$  and ISG mRNA levels in WT, Ubc9 KO, IFNAR1 KO and Ubc9/IFNAR1 DKO BMDCs activated for 0 and 4h with LPS (10ng/ml) as determined by RT-qPCR. ns: not significant.

**B-** Production of pro-inflammatory cytokines by BMDCs as in A, stimulated for 20h with increasing doses of LPS as determined by ELISA (IFN- $\beta$ ) or by flow cytometry using bead-based assays.

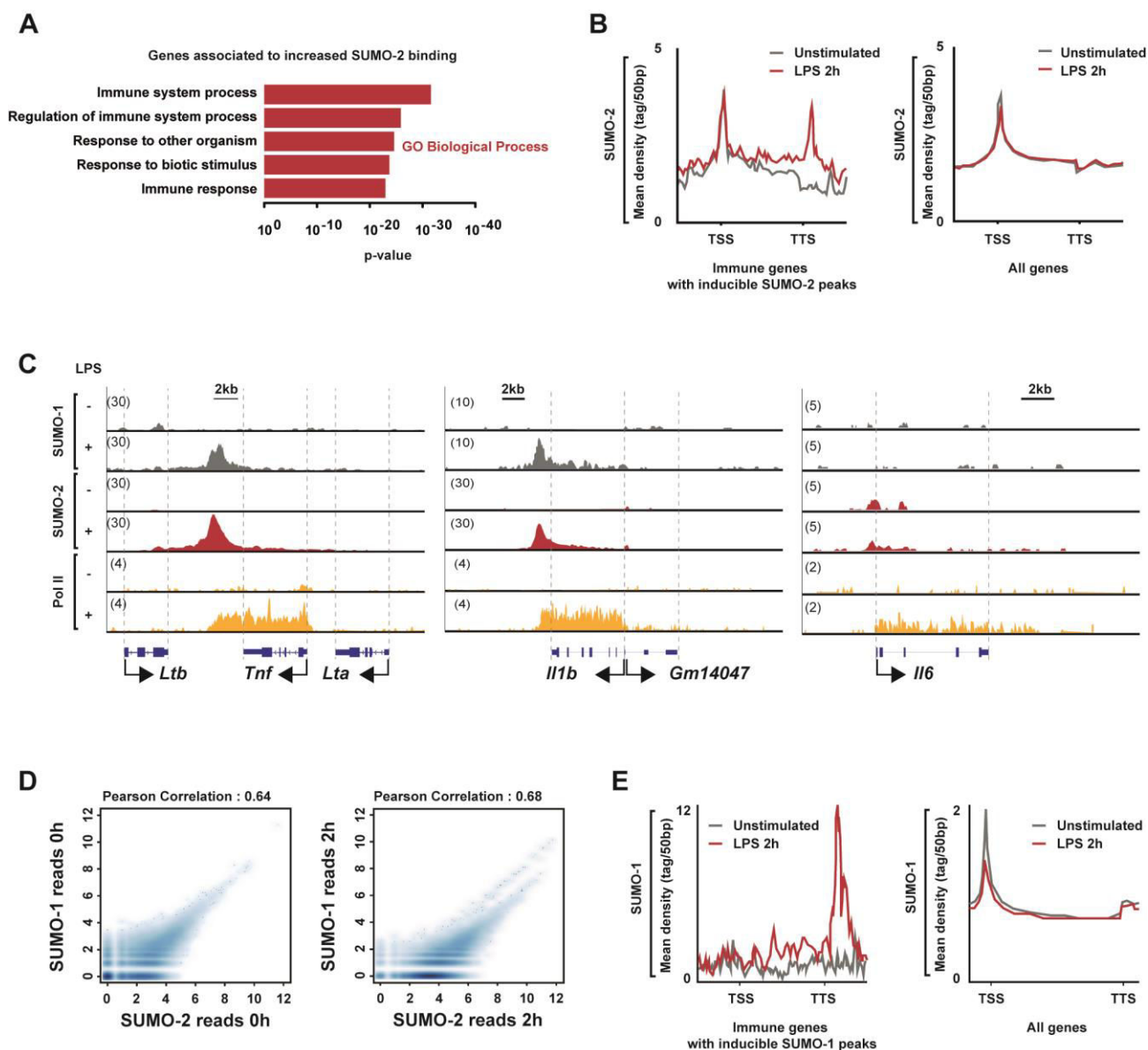
**C-** Expression of NF- $\kappa$ B target genes in BMDCs as in A, activated for 4h with LPS (10ng/ml) as determined by RT-qPCR.

**A-C-** Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p$  < 0.05.

## **Inducible binding of SUMO at the Pol II termination site upon LPS**

To then investigate whether sumoylation may regulate the innate immune transcriptional response at the chromatin level, we determined the genome-wide localization of SUMO-2 in unstimulated and LPS-stimulated BMDCs by ChIP-Seq analysis. We identified 14,208 SUMO-2 peaks in untreated cells, which were not increased upon LPS stimulation ('non-inducible' peaks, Table S4), whereas 887 peaks ('inducible peaks'; Table S4) were increased by LPS treatment at high statistical significance ( $p < 10^{-5}$ ). Ontology analysis of the genes associated with the inducible peaks revealed that they were significantly enriched for those involved in immune processes (Fig S5A and Table S5). Strikingly, precise examination of the localization of the inducible peaks in the immune genes revealed that SUMO-2 was recruited downstream of the transcriptional termination site of these genes (Fig S5B). The vast majority of these peaks (864/887; 97.4%) appeared only after LPS treatment, whereas a small fraction of them (23/887; 2.6%) was readily detectable in unstimulated BMDCs. Visualization of the *Tnf* and *Il1b* loci confirmed the significant recruitment of SUMO-2 at their 3' end upon LPS stimulation, in a region that coincides with Pol II transcriptional termination (Fig S5C; Pol II data obtained from (Garber et al., 2012)). In contrast to SUMO-1, SUMO-2 conjugation is strongly stimulated by stress (Saitoh and Hinchev, 2000). To then determine whether the inducible binding of SUMO is specific for the SUMO-2 paralog, we generated ChIP-Seq data sets for SUMO-1 in BMDCs stimulated for 0 and 2h with LPS. Profiling of SUMO-1 revealed 61 inducible peaks whereas 4511 peaks were not enhanced by LPS treatment (Table S6) indicating that the SUMO-1 profile is minimally affected by LPS relative to the SUMO-2 pattern. The SUMO-1 and SUMO-2 profiles in unstimulated and LPS-stimulated BMDCs showed a 0.64 and 0.68 correlation (Fig S5D). Like SUMO-2, SUMO-1 showed recruitment at the transcription termination site of a subset of immune genes upon LPS stimulation, but the number of affected genes was much smaller than for SUMO-2 (Fig S5C,E and Table S7). This feature was highly specific as the SUMO chromatin profile remained unaffected by LPS treatment at several other inflammatory genes such as *Il6* (Fig S5C). It has been reported recently that highly expressed regions, the so-called 'hyper-ChIPable' loci, may be vulnerable to artifactual ChIP signals (Teytelman et al., 2013). However, the fact that SUMO-2 is selectively enriched at the precise transcription termination sites, that a similar enrichment was observed only for Runx1 among the 25 other transcription factors analyzed in similar conditions (Garber et al., 2012), and that it affects a restricted set of genes among other heavily transcribed inflammatory genes makes this

hypothesis unlikely. These findings are rather suggestive of a role for SUMO in transcription termination at a restricted set of inflammatory genes in response to LPS stimulation.



**Figure S5: SUMO is recruited at the Pol II termination site upon LPS**

**A-** Gene ontology analysis of genes showing induced SUMO-2 peaks following 2h LPS treatment. The top over-represented categories are shown.

**B-** Integration of the SUMO-2 ChIP-Seq profiling of the 131 genes from the top GO category as in A (Table S5) associated to increased SUMO-2 binding. Transcription start site (TSS) and transcription termination site (TTS) are indicated. For comparison, a control set including 1000 genes randomly chosen was used.

**C-** Representative IGV screenshots showing SUMO-1, SUMO-2 and Pol II (Garber et al., 2012) ChIP-Seq data at the *Tnf*, *Il1b* and *Il6* loci in BMDCs stimulated with LPS for 0 and 2h.

**D-** Scatter plot correlation showing SUMO-1 and SUMO-2 ChIP-Seq signals in BMDCs stimulated for 0 (left) and 2h (right).

**E-** Integration of the SUMO-1 ChIP-Seq profiling of the 10 genes from the top GO category of genes showing induced SUMO-1 peaks following 2h LPS treatment (Table S7).



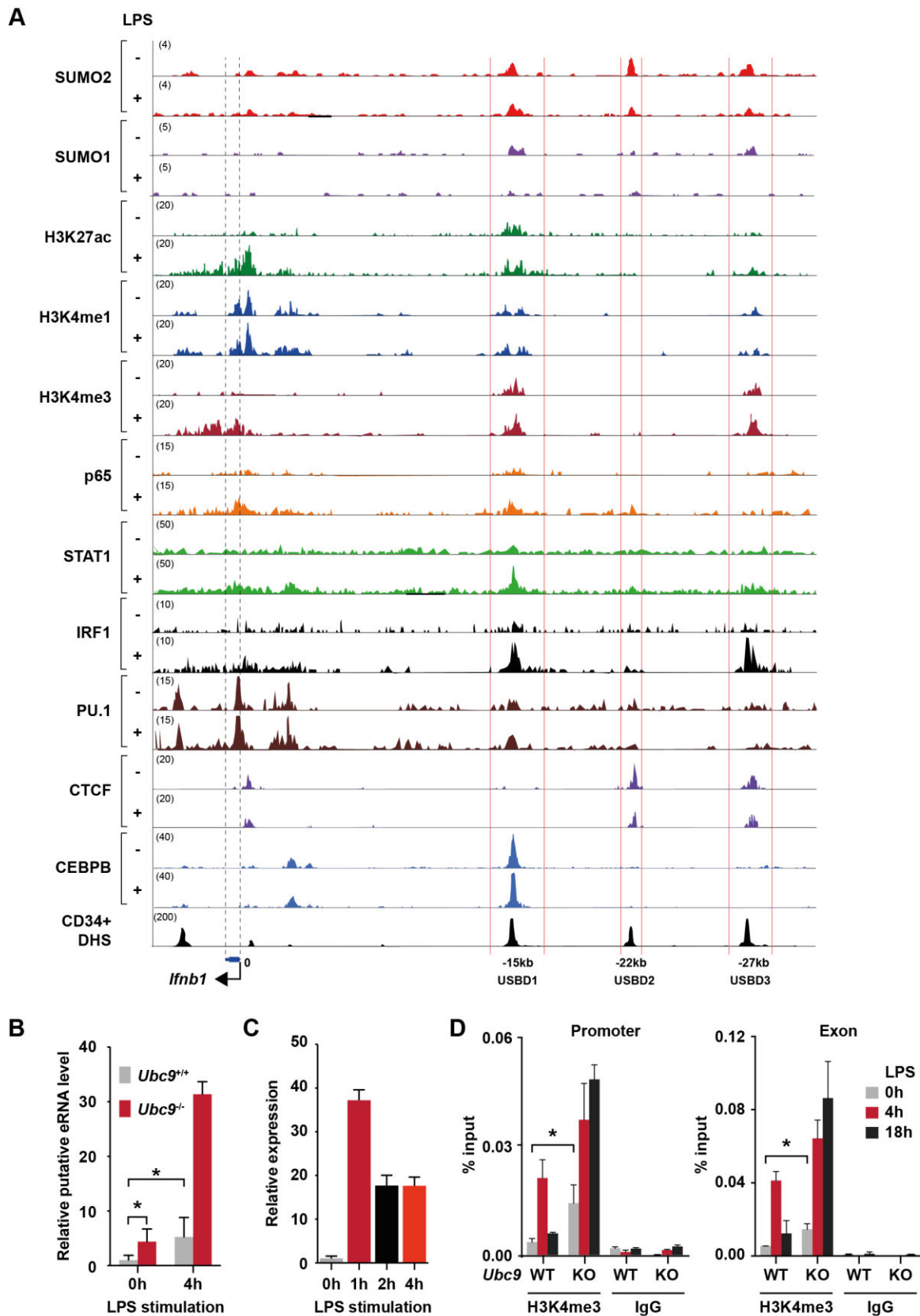
## **SUMO targets distal regulatory elements and regulates the transcriptional state of the promoter at the *Ifnb* gene**

Because the SUMO-dependent inflammatory and anti-viral transcriptional programs is abrogated in IFNAR1 KO cells, the increased transcription of the *Ifnb* gene appears as the key event underlying the function exerted by sumoylation. We thus looked at the SUMO chromatin profile at the *Ifnb* locus. In normal conditions, SUMO-2 was significantly enriched at three upstream distant regions -15, -22 and -27kb upstream of the *Ifnb* promoter, which we called Upstream SUMO Binding Domains (USBD) 1, 2 and 3 (Fig 6A). A similar binding profile, albeit much weaker at USBD2, was observed for SUMO-1. To characterize further these upstream regions, the SUMO chromatin profile was aligned with those for selected transcription factors (TFs) and histone marks generated from BMDCs obtained in the same conditions (Garber et al., 2012) and with DNaseI hypersensitivity sites (DHS) (ENCODE data base). Interestingly, a significantly large number of TFs, including numerous SUMO substrates, were present at USBDs (Fig 6A). Notably, binding sites for SUMO overlapped with DHS and co-existed with those for both the hematopoietic pioneer TF PU.1 and inflammation-activated TFs like NF $\kappa$ B, IRF-1 and STAT-1, a feature frequently observed at inflammatory gene enhancers (Ghisletti et al., 2010). If a strictly specific chromatin signature has not yet been defined for enhancers, in general, active enhancers can be identified by enrichments of acetylated H3K27 (H3K27ac) together with monomethylated H3K4 (H3K4me1) combined with lower amounts of trimethylated H3K4 (H3K4me3) (Heintzman et al., 2009). Whereas USBD2 was devoid of all of these marks, USBD1 and 3 shared chromatin features of enhancers with co-existence of H3K4me1 and H3K4me3 with H3K27ac. The three USBDs showed distinctive binding profiles for a restricted set of TFs. Notably, the CTCF architectural protein was enriched at USBD2 and 3 but absent at USBD1, whereas C/EBP- $\beta$ , a factor associated with de novo enhancer-like regions (Kaikkonen et al., 2013), was uniquely present at USBD1. Together, these data indicate that SUMO occupies a set of three distal DNA modules at the *Ifnb* locus that are expected to exert distinct regulatory functions.

We then investigated the potential change in SUMO chromatin occupancy following 2h stimulation with LPS. SUMO-1 was released from the distal regulatory domains in LPS-stimulated BMDCs and a similar reduction, albeit weaker, was observed for SUMO-2 at USBD2 and 3 (Fig 6A). Thus the presence of SUMO at USBDs anti-correlates with activation of *Ifnb* gene transcription. Enhancers have been found recently to direct the expression of

enhancer RNAs (eRNAs) which are preferentially enriched at enhancers engaged in chromatin looping with promoters (Lam et al., 2014). Given the enhancer-like feature of USBD1, we investigated whether transcription is associated with this locus by RT-qPCR. A transcript was detected at very low level in normal conditions in wild-type BMBCs, which was induced 5-fold upon LPS stimulation (Fig 6B). Similar data were obtained in the macrophage RAW264.7 cells with an even higher induction (37-fold) (Fig 6C). Loss of Ubc9 led to the enhanced expression of this putative eRNA both at steady state (5-fold) and in LPS-stimulated (30-fold) conditions in BMDCs. Thus USBD1 drives the expression of a putative LPS-induced eRNA and impairment of sumoylation leads to its superinduction.

To then understand how sumoylation represses the transcription of *Ifnb*, we examined the effect of sumoylation deficiency on the chromatin status of the *Ifnb* promoter by analyzing the level of the active chromatin mark H3K4me3 in Ubc9 WT and KO BMDCs. In normal conditions, Ubc9 depletion led to elevated basal levels of H3K4me3 at both *Ifnb* promoter and exonic region (Fig 6D), suggesting that the *Ifnb* gene is already primed or actively involved in transcription. As expected, upon LPS treatment, the presence of this mark increased at 4h to decay back to its normal level at 18h in wild-type cells. In contrast, in the absence of Ubc9, the level of H3K4me3 markedly increased at 4h and continued to increase significantly under the persistent LPS-stimulation conditions (Fig 6D). This indicates that reduced sumoylation primes activation of the *Ifnb* promoter both at steady state and during innate sensing. Collectively, these data suggest that SUMO coordinates higher-order spatial organization at the *Ifnb* locus through distal *cis*-regulatory genetic elements to assure a chromatin environment that restrains transcription at the *Ifnb* promoter.



**Figure 6: SUMO targets and regulates the *Ifnb* gene**

**A-** IGV screenshot at the *Ifnb* locus showing SUMO-2 profile aligned with the binding profiles for selected transcription factors and histone modifications as published in (Garber et al., 2012) in GM-CSF-induced BMDCs stimulated with LPS for 0 and 2h. Bottom track shows DNase I hypersensitive

peaks from the ENCODE database. Upstream SUMO Binding Domains USBD1, 2 and 3 are indicated.

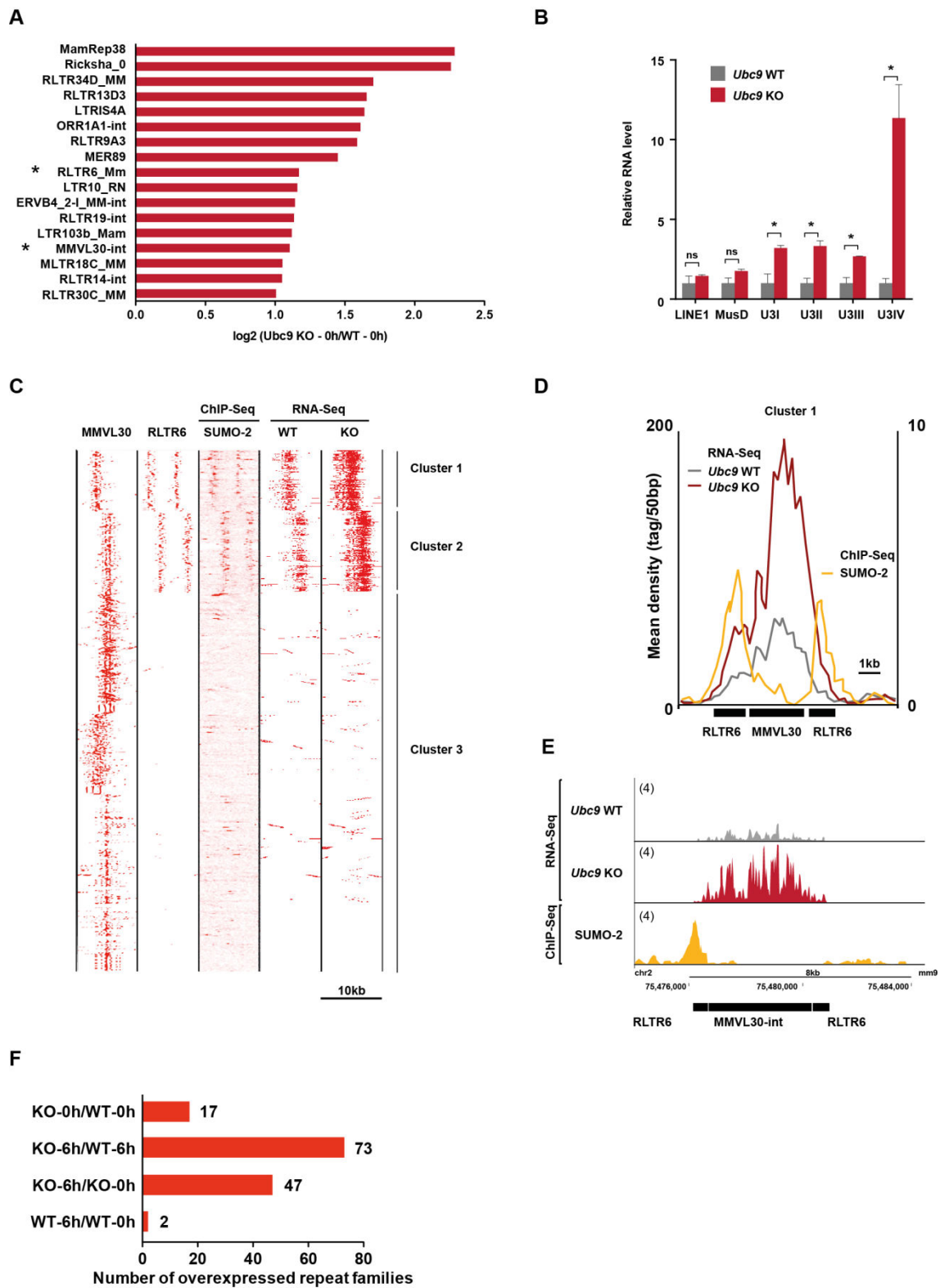
**B-** Expression of a putative eRNA at USBD1 as detected by RT-qPCR in Ubc9 WT and KO BMDCs treated for 0 and 4h with LPS. Mean  $\pm$ SD; \* $p$  <0.05, n=3.

**C-** RT-qPCR analysis of putative eRNA in RAW264.7 cells treated with LPS for the indicated times.

**D-** ChIP-qPCR assays for H3K4me3 at the *Ifnb* promoter and exon in Ubc9 WT and KO BMDCs stimulated by LPS for 0, 4 and 18h. Mean  $\pm$ SD; \* $p$  <0.05, n=3.

## Sumoylation deficiency leads to the up-regulation of endogenous retroelements

Given that the over-production of IFN- $\beta$  in Ubc9 KO cells results, in large part, from a cell-intrinsic/cell-autonomous process, we tested the hypothesis that sumoylation may also control expression of endogenous retroviruses (ERVs). This for two reasons: (i) accumulation of endogenous nucleic acids (NAs) derived from ERVs has been shown to trigger elevated production of IFN-I, a process mediated by the interferon-stimulatory NAs pathway that may lead to autoimmunity (Crow and Rehwinkel, 2009; Herquel et al., 2013; Stetson et al., 2008). (ii) Sumoylation is required for gene silencing mediated by Trim28/KAP1 (Ivanov et al., 2007), a major repressor of ERVs (Rowe et al., 2010). We performed total RNA sequencing (RNA-Seq) on Ubc9 KO versus WT BMDCs treated with LPS for 0 and 6h and identified 788 and 1349 up-regulated coding transcripts respectively (Fig S6A, Tables S8 and S9) with a strong enrichment for genes associated with the immune response (Fig S6B), in agreement with the microarray data. In addition, we detected up-regulation of 17 repetitive DNA elements in unstimulated Ubc9 KO BMDCs when compared to wild-type cells (Fig 7A). We focused on the VL30 ERV family (MMVL30) and their associated LTRs (RLTR6) since their derepression has been shown to correlate with activation of the IFN-I response (Herquel et al., 2013). Expression of the LTRs of each of the four VL30 subgroups was significantly induced as analyzed by RT-qPCR (Fig 7B), with VL30 class IV showing the highest induction (~12-fold). Similar data were observed in unstimulated Ubc9 KO MEFs that exhibited accumulation of VL30 transcripts with time (Fig S6C). To then determine whether SUMO is present at VL30 LTRs, we looked at the SUMO-2 chromatin profile by ChIP-Seq analysis of unstimulated wild-type BMDCs. SUMO-2 was found to be present at the vast majority of the LTRs flanking the VL30 elements (Fig 7C,D), suggesting a direct role for SUMO at LTRs in repressing expression of retroviral elements. A representative example is shown on chromosome 2 (Fig 7E). We then examined expression of repetitive DNA elements upon LPS treatment. Loss of Ubc9 in BMDCs was found to induce derepression of a large number (73) of repeated sequences upon LPS treatment when compared to control cells (Fig 7F and Table S10). By contrast, only 2 such elements were LPS-induced in wild-type BMDCs (Fig 7F), indicating that up-regulation of retroelements upon LPS is a rare event under normal conditions. Together, these data indicate that sumoylation prevents the accumulation of nucleic acids derived from endogenous retroelements, possibly through direct modification of LTR-bound transcription factors.



**Figure 7: Sumoylation keeps in check expression of endogenous retroelements.**

A- List of transcripts from endogenous retroelements showing increased expression (fold change >2,  $p < 0.05$ , using the adjusted Bonferroni correction) in unstimulated Ubc9 KO BMDCs when compared to Ubc9 WT cells. Data are representative of 3 experiments.

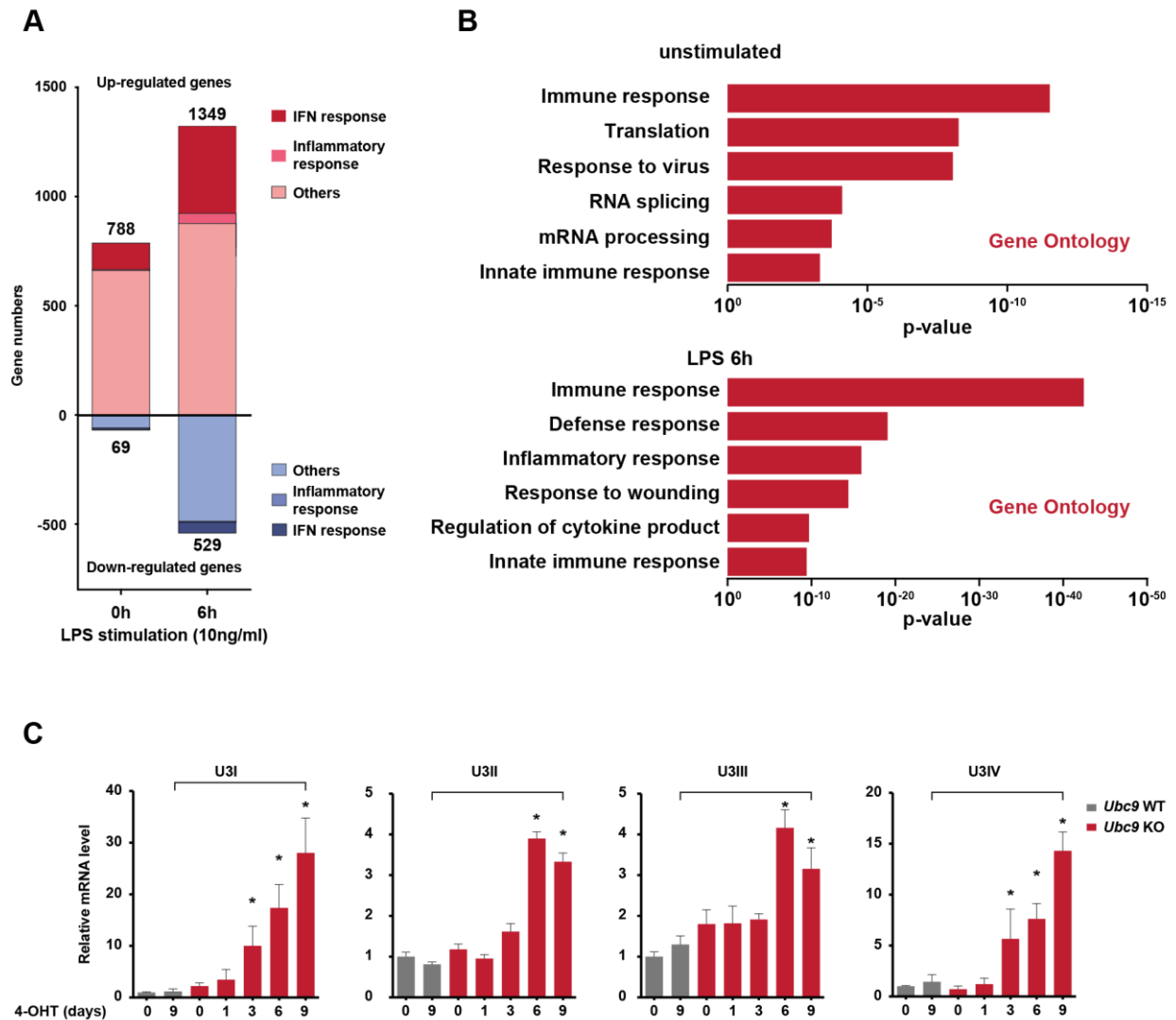
**B-** RT-qPCR on the LTRs of the different VL30 subtypes in RNA from Ubc9 WT and KO BMDCs. IAP and MusD repeats were used as negative controls. Mean  $\pm$ SD; \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney test), (n=3).

**C-** Clustering comparison of SUMO2 ChIP-Seq (WT BMDCs) and RNA-Seq reads (Ubc9 WT and KO BMDCs) with respect to MMVL30 and RLTR6 coordinates as determined by BLAST. Comparison of the tag density in the region of  $\pm 5$  kb around the VL30 elements. Clustering identifies 3 classes as indicated.

**D-** Integration of the RNA-Seq profiling in unstimulated Ubc9 WT and KO BMDCs with the SUMO2 ChIP-Seq profiling in unstimulated Ubc9 WT BMDCs.

**E-** Genome browser view of the RNA-Seq and ChIP-Seq data as in D at a specific VL30 locus on chromosome 2.

**F-** Histogram showing the number of overexpressed repeat families in the indicated conditions.



### Sup Figure S5: Gene expression upon loss of Ubc9

**A-** Differentially expressed genes in Ubc9 KO vs WT BMDCs stimulated for 0 and 6h with LPS as determined by RNA-Seq (fold change >2- or <-2,  $p < 0.05$ , using the adjusted Bonferroni correction). Dark red/blue indicates viral and IFN-regulated genes as determined using the interferome data base (<http://interferome.org/>), medium red/blue indicates the inflammatory response as determined by genes differentially expressed in LPS-treated vs untreated WT DCs excluding IFN-regulated genes, and light red/blue indicates other genes.

**B-** Gene ontology analysis of up-regulated genes in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated for 0 (upper panel) and 6h (lower panel) with LPS.

**C-** RT-qPCR on the LTRs of the different VL30 subtypes in RNA from *Ubc9<sup>+/+</sup>/T2* (WT) and *Ubc9<sup>fl/-</sup>/T2* (F/-) MEFs treated by 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) for indicated days. Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent biological replicates performed in triplicate. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney test).



## DISCUSSION

We show here that sumoylation plays a central role in the control of inflammation, both at steady state and during innate responses to TLR ligands. The main target of sumoylation-mediated control of inflammation is the *Ifnb* gene. SUMO occupies distant DNA elements, which are de-sumoylated upon stimulation of the cells by TLR-ligands. Reduced sumoylation in Ubc9 KO cells turns the *Ifnb* promoter into an active state, both at steady state and during innate stimulation. As a result, Ubc9 KO cells secrete basal levels of IFN- $\beta$  in the absence of stimulation. After stimulation by TLR-ligands, the levels of inflammatory cytokines transcription and secretion are strongly increased, both *in vitro* and *in vivo*. Increased inflammatory cytokine secretion by Ubc9 was abolished in Ubc9/IFNAR1 double defective cells, indicating a critical role for IFN-I secretion in the exacerbated inflammatory response. Although sumoylation serves multiple functions in cells through modification of multiple targets, overall decreased sumoylation levels have one major consequence on cell functions: increased constitutive and induced IFN- $\beta$  production.

Constitutive secretion of IFN-I occurs both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, the only type of IFN-I that is constitutively secreted is IFN- $\beta$ , which is considered as a master regulator in the IFN-I family. The levels of secreted IFN-I are extremely low (often below detection), but yet have important biological effects. In IRF-2 (an attenuator of IFN- $\beta$  expression) KO mice, the constitutive production of a subset of IFN-responsive genes is increased whereas the levels of IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  were not affected (Hida et al., 2000). The authors show major consequences on hematopoietic stem cell niches and development, but eventual effects on inflammatory responses were not analyzed. Our experimental model of induced Ubc9-depletion allowed the analysis of the functional consequences of increasing the constitutive production of IFN- $\beta$  on mature hematopoietic cells. One of the major observed phenotypes was a very marked increase in the secretion of inflammatory cytokines.

Others showed that constitutive IFN-I secretion can affect responsiveness to other cytokines (including IFN $\gamma$  or IL-6), but the mechanisms involved are still debated. It was proposed that 'tonic signaling' affects the levels of different signaling intermediates (including STATs) and thereby the secretion of other cytokines. Effect of IFN- $\beta$ , on the secretion of other cytokines, in contrast, was not reported before, to our best knowledge. Indeed, we found that in Ubc9-defective cells, not only the constitutive and the induced IFN- $\beta$  responses were

enhanced, but we also observed a marked increase in the secretion of multiple inflammatory cytokines and chemokines. Secretion of these inflammatory mediators required IFNAR expression, suggesting that IFN-I-mediated signaling is involved. Similar requirement for IFN-I receptor signaling was reported for IL-6 production induced by cytosolic DNA in Trex-1 mutant cells (Stetson et al., 2008). The mechanistic link between IFN-I and the induction of other inflammatory cytokines by innate stimuli is still unclear. We show that the induction occurs at the levels of transcription of the cytokines, and that SUMO-1 and/or 2 are recruited upstream of the corresponding cytokine genes, suggesting that reduced sumoylation could act both through IFN-I induction and directly on the cytokine/chemokine genes.

Indeed, systematic analysis of SUMO recruitment to the chromatin using Chip-Seq in DCs treated or not with LPS, revealed a series of peaks in a variety of genes related to immunity, including multiple cytokines and chemokines. These SUMO peaks are found at the 3' end of the coding regions, in proximity to the sites of termination of transcription (as defined using Chip-Seq for Pol II). These results suggest a possible role for SUMO in the termination of transcription of immune genes, a model consistent with increased transcription when sumoylation is reduced. It has been reported recently that senataxin (SETX), an RNA/DNA helicase involved in Pol II transcription termination which is mutated in some neurological disorders, constitutes a *bona fide* SUMO substrate. Moreover, SETX sumoylation is required for recruitment of Rrp45, a subunit of the exosome (Richard et al., 2013). SETX thus appears as a candidate substrate for SUMO at the 3'end of LPS-stimulated genes. In addition, Runx1, an essential transcription factor for hematopoiesis, was found to be recruited at the 3'end of inflammatory genes upon LPS treatment (Garber et al., 2012). Runx1 was recently found to be sumoylated and may serve as an additional SUMO substrate at the Pol II termination site (Kim et al., 2014). An eventual direct effect of SUMO on inflammatory cytokine genes, however, fails to account for the clear dependency of the cytokine phenotype on IFNAR-1 expression. In addition, LPS-dependent recruitment of SUMO was not evident on the 3' end of the *Ifnb* gene.

How then does sumoylation negatively regulates the expression of IFN- $\beta$  ? Using genome-wide approaches, we found that SUMO-1 and -2 occupy three main regions (-15, -22 and -27kb) upstream of the gene promoter. Upon treatment with LPS, these three regions displayed reduced levels of sumoylation. These regions (especially -15 and -27kb) also contained mono- and tri-methylated H3K4, and -15kb was also marked by acetylated H3K27. These regions also bind transcription factors including PU.1 and CTCF. Upon LPS

stimulation of the cells, increased levels of p65 were also present at these three positions. NFκB-dependent chromatin associations regulating *Ifnb* gene expression were reported previously using 4C (Ford and Thanos, 2010). The regulation of the *Ifnb* gene expression, like that of many other genes, is regulated by distant elements. Demonstrating that these elements actually control the transcription of the *Ifnb* gene will be a major objective for future research. Our present results show that LPS modulates the sumoylation and recruitment of modulators of transcription at potential regulatory elements upstream of the *Ifnb* gene. Ubc9 depletion affected the transcriptional activity of the *Ifnb* promoter increasing basal and induced levels of H3K4me3 in LPS-treated and untreated cells, suggesting a direct role of sumoylation on the transcriptional activity of the promoter. This work paves the way towards characterization of the possible SUMO substrates at the *Ifnb* loci, bearing in mind that these targets are likely to be multiple. Indeed, SUMO was reported to affect not only individual proteins but rather to operate synergistically at the level of entire complexes (Psakhye and Jentsch, 2012). Significant effort will be required to identify such substrates as individual mutations may have only minor effects, when combined mutations are expected to lead to cumulative phenotypes.

Finally, this study opens new perspectives for the manipulation of the SUMO pathway in the context of inflammation. Sumoylation is an easily druggable pathway and different specific inhibitors of protein sumoylation targeting the SUMO E1 and E2 enzymes have been described (Fukuda et al., 2009; Kim et al., 2013). Such inhibitors would be expected to induce IFN-I secretion and inflammation with possible applications in vaccination or cancer. Conversely, desumoylases inhibitors, yet to be developed, should limit inflammation. Future studies will hopefully explore if the manipulation of this pathway has potential therapeutic applications.

## SUPPLEMENTAL TABLES

**Table S1:** List of 224 genes differentially expressed in unstimulated Ubc9 KO vs WT BMDCs as determined by microarray analysis in 3 biological replicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni) **ANNEXE 1**

**Table S2:** List of 281 genes differentially expressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 1h as determined by microarray analysis in 3 biological replicates performed in triplicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni) **ANNEXE 2**

**Table S3:** List of 880 genes differentially expressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 6h as determined by microarray analysis in 3 biological replicates performed in triplicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni) **ANNEXE 3**

**Table S4:** List of LPS-inducible and non-inducible SUMO-2 peaks in BMDCs. In sheet 1, SUMO-2 peaks enriched at 2 h (as compared to the untreated sample) with a  $p < 10^{-5}$  are shown with their main features, including chromosomal location,  $p$  value, RefSeq and gene description. Peaks were ordered by  $p$  value. Peaks were color-coded as follows: green, intergenic; brown, non-coding; yellow, peaks surrounding TSS of RefSeq genes; dark blue, intronic; grey, exonic; orange, 3'UTR; light blue, 5'UTR; and red, TTS. In sheet 2, list of noninducible SUMO-2 peaks detected in untreated sample as in sheet 1.

**Table S5:** List of 131 genes from the top GO category as in Fig S5A 'Immune system process' associated to increased SUMO-2 binding. **ANNEXE 4**

**Table S6:** List of LPS-inducible and non-inducible SUMO-1 peaks in BMDCs. In sheet 1, SUMO-1 peaks enriched at 2 h (as compared to the untreated sample) with a  $p < 10^{-5}$  are shown with their main features, including chromosomal location,  $p$  value, RefSeq and gene description. Peaks were ordered by  $p$  value. Peaks were color-coded as follows: green, intergenic; brown, non-coding; yellow, peaks surrounding TSS of RefSeq genes; dark blue,

intronic; grey, exonic; orange, 3'UTR; light blue, 5'UTR; and red, TTS. In sheet 2, list of non-inducible SUMO-1 peaks detected in untreated sample as in sheet 1.

**Table S7:** List of 10 genes from the top GO category as in Fig S5A 'Cytokine activity' associated to increased SUMO-1 binding. **ANNEXE 5**

**Table S8:** List of 863 genes differentially expressed in unstimulated Ubc9 KO vs WT BMDCs as determined by RNA-Seq in 3 biological replicates (fold change  $\geq 1.5$  or  $\leq -1.5$ ,  $p < 0.05$ , Benjamini and Hochberg)

**Table S9:** List of 1878 genes differentially expressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 6h as determined by RNA-Seq in 3 biological replicates (fold change  $\geq 1.5$  or  $\leq -1.5$ ,  $p < 0.05$ , Benjamini and Hochberg)

**Table S10:** List of 73 repeated DNA elements overexpressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 6h as determined by RNA-Seq in 3 biological replicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Benjamini and Hochberg) **ANNEXE 6**

**Table S11 :** List of primers used in this study. **ANNEXE 7**

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Antibodies and reagents**

The antibodies used for western blotting were from Abcam, Santa Cruz Biotechnology or Cell Signaling Technology. They were specific for Ubc9 (clone EP2938Y), SUMO-1 (Y299), SUMO-2 (8A2), GAPDH (6C5), SP1 (monoclonal mouse IgG), actin (AC-15), tubulin (B-5-1-2), NFκB p65 (rabbit polyclonal IgG), phospho-SAPK/JNK (81E11), SAPK/JNK (rabbit polyclonal IgG), phospho-p38 (D3F9), p38 (rabbit polyclonal IgG), phospho-ERK1/2 (D13.14.4E), ERK1/2 (rabbit polyclonal IgG) and IκBα (44D4). Fluorochrome-conjugated antibodies used for flow cytometry were from BD or eBioscience and included those specific for CD11c (clone HL3), I-Ab (AF6-120.1), CD40 (3/23), CD86 (GL1), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), Gr-1 (RB6-8C5), CD11b (M1/70), B220 (RA3-6B2), CD24 (M1/69) and F4/80 (BM8). Zymosan, PAM3CsK4, LPS (ultrapure, from E. coli 0111:B4) and CpG ODN 1668 were from Invivogen. TNF-α was from R&D systems.

### **Mice**

Ubc9<sup>+/+</sup>/ROSA26-CreERT2 and Ubc9<sup>fl/-</sup>/ROSA26-CreERT2 mice were generated as previously described (Demarque et al., 2011) by intercrossing Ubc9<sup>fl/-</sup> and ROSA26-CreERT2 mice. Only littermates were used and compared in all experiments. IFNAR1-deficient mice (Müller et al., 1994) were a gift from Dr Matthew L Albert (Pasteur Institute, Paris, France). All of these mice were bred at the Pasteur Institute animal facility (Paris, France) under specific pathogen-free conditions. CD45.1<sup>+</sup> congenic C57BL/6 mice were bred and housed at the Curie Institute (Paris, France). All experiments involving animals were performed in compliance with the relevant laws and institutional guidelines and have been approved by the local ethics committee.

### **Cell culture**

Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were differentiated from Ubc9<sup>+/+</sup>/ROSA26-CreERT2 and Ubc9<sup>fl/-</sup>/ROSA26-CreERT2 hematopoietic precursors. Total bone marrow cells were cultured for 10 days in complete culture medium (IMDM supplemented with 2 mM Glutamax, 1 mM sodium pyruvate, 1x non-essential amino acids, 10,000 units/mL penicillin,

10,000  $\mu\text{l}/\text{mL}$  streptomycin, 50 mM 2- $\beta$ -mercaptoethanol (all from Life Technologies) and 10% fetal calf serum (FCS; Eurobio)) and in the presence of recombinant mouse GM-CSF (eBioscience, 20 ng/ml) or Flt-3 ligand (R&D systems, 50 ng/ml). From day 6, the medium was supplemented with 100nM 4-hydroxytamoxifen (Sigma). Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were differentiated following a similar protocol but using M-CSF (R&D systems, 20 ng/mL). For analysis of cytokine and chemokine production,  $1 \times 10^5$  to  $2 \times 10^5$  cells per well were cultured for 24 h in 96-well flat-bottomed plates in 200  $\mu\text{l}$  culture medium in the presence of the indicated amount of LPS, CpG, Pam3CSK4, Zymosan or TNF- $\alpha$ . For RNA isolation or biochemical assays,  $5 \times 10^5$  BMDCs per well were cultured for the indicated time in 24-well plates in 0.5 ml culture medium containing or not 10 ng/mL LPS. MEFs were generated from E12.5 embryos and cultured in DMEM (Life Technologies) supplemented with penicillin, streptomycin and 10% heat-inactivated foetal calf serum (Eurobio). THP-1 and RAW264.7 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with penicillin, streptomycin and 10% heat-inactivated foetal calf serum (Eurobio).

### **Flow cytometry**

The phenotype and maturation status of BMDCs and BMDMs were analyzed by flow cytometry at the end of the culture.  $1 \times 10^6$  cells were first incubated on ice for 20 min in 50  $\mu\text{l}$  of FACS buffer (PBS, 2 mM EDTA, 1% FCS) supplemented with Fc block (2.4G2, BD) and rat IgG. Cells were then labeled on ice and protected from light for 30 min by adding 50  $\mu\text{l}$  of FACS buffer containing saturating amount of the antibodies of interest. After staining, cells were washed twice and resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of FACS Buffer. Data were acquired on a MACSquant Q10 cytometer (Miltenyi) and analyzed using the FlowJo software (Tree Star).

### **Shigella infection**

The invasive *Shigella flexneri* serotype 5a strain M90T (Sansone and Mounier, 1987) was grown in Luria broth at 37°C with aeration. The bacterial titer was calculated as follows: 1 OD at 600nm corresponds to  $5 \times 10^8$  bacteria/ml. MEFs were infected with *Shigella flexneri* M90T at a MOI of 50 for indicated time in DMEM.

### **Measurements of cytokines and chemokines**

The concentration of cytokines and chemokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL-10, IL-10) present in the sera and in the culture supernatants was measured by flow-cytometry using bead-based multiple analytes detection system (Flow cytomix, eBioscience) according to manufacturer's instructions. Data were acquired on a MACSquant Q10 cytometer (Miltenyi) and analyzed using the Flow Cytomix Pro software (eBioscience). IFN- $\beta$  concentrations were measured using VeriKine™ Mouse Interferon Beta ELISA Kit (PBL Assay Science) according to manufacturer's instructions.

### **Microarray analysis**

Total RNA was collected using TRIzol extraction. RNA integrity and concentration were evaluated using 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 Nano kit from Agilent. Three biological replicates were analyzed for each condition. For each array, the cell intensity files (CEL) were generated with an Affymetrix GeneChip Scanner 3000. Gene-level expression values were derived from the CEL file probe-level hybridization intensities using the model-based Robust Multichip Average algorithm (RMA). Statistical analysis to compare replicates' arrays was done with the local poor error test. The P-values were adjusted using the Bonferroni algorithm and a threshold of  $P < 0.05$  is used as the criterion for expression. Functional annotation was performed by DAVID software.

### **RNA isolation and RT-qPCR**

Total RNAs were isolated using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). cDNAs were generated from 1  $\mu$ g total RNAs using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). mRNA levels were assessed by quantitative real-time PCR analysis using Power SYBR green master mix (Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA) with the primer sets listed in Table S11.  $\Delta\Delta$ Ct values were normalized with those obtained from the amplification of endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Hprt) and beta-actin (Actb) mRNAs. Quantitative real-time PCR was performed on the CFX96 PCR system (Biorad) using standard parameters.



### ***In vivo* model of endotoxin-mediated septic shock**

Bone marrow from femurs and tibias was collected from Ubc9<sup>+/+/T2</sup> or Ubc9<sup>fl/-/T2</sup> CD45.2<sup>+</sup> mice in complete medium. Single-cell suspensions were washed three times in PBS and filtered through a 70mm cell strainer.  $5 \times 10^6$  cells were then injected intravenously into  $\gamma$ -irradiated CD45.1<sup>+</sup> B6 hosts (11 Gy; 137Cs source) that were kept on acidified water for the complete duration of the experiment. 6 to 10 weeks post-graft, hematopoietic reconstitution was assessed on blood samples by flow cytometry. More than 95% of the myeloid compartment was systematically of donor (CD45.2<sup>+</sup>) origin. Mice were injected intraperitoneally with 4-hydroxytamoxifen (100mg per injection, three injections separated by twelve hours) and were then challenged with LPS (25 mg/kg) or with PBS. Mouse survival was monitored every 4 to 8h. All the mice that did not succumb to endotoxin injection during the first 3 days quickly recovered afterwards and survived for more than 4 weeks. In certain experiments, blood samples were taken up 6h after LPS injection to quantify the amount of pro- and anti-inflammatory mediators in the serum.

### **VSV**

Cells were incubated for one hour in the presence of virions at the indicated multiplicity of infection, washed and incubated for 24h. Titers were obtained by plaque assay.

### **Chromatin immunoprecipitation**

Chromatin immunoprecipitation was performed as described in (Blecher-Gonen et al., 2013). Briefly, cells were fixed in culture medium with formaldehyde (1% final) for 10 minutes at room temperature. Formaldehyde was then quenched with glycine (125 mM final). Cells were washed in ice cold PBS and lysed in RIPA buffer. The extracted chromatin was sonicated using the Bioruptor Pico (Diagenode) until chromatin fragments reached a size comprised between 200-500bp, as assayed by agarose gel electrophoresis. Immunoprecipitation was performed overnight at 4°C using antibodies specific for SUMO-2 (gift from M. Dasso) and RNA Pol II (8WG16, Covance) in the presence of Protein G Dynabeads (Life Technologies). Beads were then extensively washed and the immunoprecipitated chromatin was eluted. The crosslinking was reversed by incubating the chromatin at 65°C for 4 hr. RNAs and proteins were then digested by sequential treatment with RNaseA and Proteinase K, respectively.

DNA was purified using SPRI beads and ethanol wash, and eventually eluted in Tris-EDTA buffer.

### **Sequencing and analysis**

ChIP libraries were indexed, pooled and sequenced on Illumina HiSeq-2000 sequencers at the Weizmann Institute (Rehovot, Israel). Reads were aligned onto the mm9 assembly of the mouse genome using bowtie2.0 (Langmead and Salzberg, 2012) as described in (Garber et al., 2012). Peak calling was performed using MACS with default settings, except for SUMO-1 for which an m-fold of 10 was used. Peaks were annotated using HOMER. Gene ontology analysis of increased peaks was performed using GREAT. Reads profiling and correlation between SUMO-1 and SUMO-2 reads were obtained using seqMINER (Ye et al., 2011).

### **Statistical analysis**

A Log rank test was used for survival curves. For cytokine production and mRNA comparison, a Mann-Whitney test was used.

### **Lentiviral infections**

Large-scale production of VSV-G pseudotyped lentivirus was performed by calcium phosphate transfection of 293FT cells (Invitrogen) with pLKO.1 and helper plasmids pMD2.G and psPAX2 (Addgene plasmid 12259 and 12260). Viral supernatant was collected 48 h after transfection, and filtered through a Stericup-HV PVDF 0.45- $\mu\text{m}$  filter. THP-1 cells were plated in 12-well dishes at 1,000,000 cells per well and incubated with lentivirus in the presence of polybrene ( $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) overnight. After 2 days, infected cells were positively selected with puromycin ( $2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) for 2 days and cultured for 12 days before performing described assays.

## REFERENCES

- Blanc, M., Hsieh, W.Y., Robertson, K. a, Watterson, S., Shui, G., Lacaze, P., Khondoker, M., Dickinson, P., Sing, G., Rodríguez-Martín, S., et al. (2011). Host defense against viral infection involves interferon mediated down-regulation of sterol biosynthesis. *PLoS Biol.* 9, e1000598.
- Blecher-Gonen, R., Barnett-Itzhaki, Z., Jaitin, D., Amann-Zalcenstein, D., Lara-Astiaso, D., and Amit, I. (2013). High-throughput chromatin immunoprecipitation for genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions and epigenomic states. *Nat. Protoc.* 8, 539–554.
- Cook, D.N., Pisetsky, D.S., and Schwartz, D.A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Immunol.* 5, 975–979.
- Crow, Y.J., and Rehwinkel, J. (2009). Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* 18, R130–6.
- Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., et al. (2006). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.* 38, 917–920.
- Demarque, M.D., Nacerddine, K., Neyret-Kahn, H., Andrieux, A., Danenberg, E., Jouvion, G., Bomme, P., Hamard, G., Romagnolo, B., Terris, B., et al. (2011). Sumoylation by Ubc9 regulates the stem cell compartment and structure and function of the intestinal epithelium in mice. *Gastroenterology* 140, 286–296.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 Modification of I $\kappa$ B $\alpha$  Inhibits NF- $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell* 2, 233–239.
- Essers, M.A.G., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904–908.
- Everett, R.D., Boutell, C., and Hale, B.G. (2013). Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 400–411.
- Ford, E., and Thanos, D. (2010). The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 328–336.
- Fu, J., Xiong, Y., Xu, Y., Cheng, G., and Tang, H. (2011). MDA5 is SUMOylated by PIAS2 $\beta$  in the upregulation of type I interferon signaling. *Mol. Immunol.* 48, 415–422.

- Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., and Kimura, K. (2009). Ginkgolic Acid Inhibits Protein SUMOylation by Blocking Formation of the E1-SUMO Intermediate. *Chem. Biol.* *16*, 133–140.
- Garber, M., Yosef, N., Goren, A., Raychowdhury, R., Thielke, A., Guttman, M., Robinson, J., Minie, B., Chevrier, N., Itzhaki, Z., et al. (2012). A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* *47*, 810–822.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 947–956.
- Ghisletti, S., Barozzi, I., Mietton, F., Polletti, S., De Santa, F., Venturini, E., Gregory, L., Lonie, L., Chew, A., Wei, C.-L., et al. (2010). Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. *Immunity* *32*, 317–328.
- Glass, C.K., and Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 365–376.
- Gough, D.J., Messina, N.L., Clarke, C.J.P., Johnstone, R.W., and Levy, D.E. (2012). Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity* *36*, 166–174.
- Haller, O., Staeheli, P., and Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* *89*, 812–818.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* *18*, 1–12.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., et al. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* *459*, 108–112.
- Herquel, B., Ouararhni, K., Martianov, I., Le Gras, S., Ye, T., Keime, C., Lerouge, T., Jost, B., Cammas, F., Losson, R., et al. (2013). Trim24-repressed VL30 retrotransposons regulate gene expression by producing noncoding RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 339–346.
- Hida, S., Ogasawara, K., Sato, K., Abe, M., Takayanagi, H., Yokochi, T., Sato, T., Hirose, S., Shirai, T., Taki, S., et al. (2000). CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity* *13*, 643–655.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., et al. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* *434*, 772–777.

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.

Kaikkonen, M.U., Spann, N.J., Heinz, S., Romanoski, C.E., Allison, K.A., Stender, J.D., Chun, H.B., Tough, D.F., Prinjha, R.K., Benner, C., et al. (2013). Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Mol. Cell* 51, 310–325.

Karaghiosoff, M., Steinborn, R., Kovarik, P., Kriegshäuser, G., Baccarini, M., Donabauer, B., Reichart, U., Kolbe, T., Bogdan, C., Leanderson, T., et al. (2003). Central role for type I interferons and Tyk2 in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *Nat. Immunol.* 4, 471–477.

Kim, J.-H., Jang, J.-W., Lee, Y.-S., Lee, J.-W., Chi, X.-Z., Li, Y.-H., Kim, M.-K., Kim, D.-M., Choi, B.-S., Kim, J., et al. (2014). RUNX family members are covalently modified and regulated by PIAS1-mediated sumoylation. *Oncogenesis* 3, e101.

Kim, Y.S., Nagy, K., Keyser, S., and Schneekloth, J.S. (2013). An electrophoretic mobility shift assay identifies a mechanistically unique inhibitor of protein sumoylation. *Chem. Biol.* 20, 604–613.

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Tailor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., and Ozato, K. (2008). Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J. Biol. Chem.* 283, 25660–25670.

Lam, M.T.Y., Li, W., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2014). Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* 39, 170–182.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.

Lee, J.H., Park, S.M.S.J., Kim, O.S., Lee, C.S., Woo, J.H., Park, S.M.S.J., Joe, E., and Jou, I. (2009). Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol. Cell* 35, 806–817.

Liang, Q., Deng, H., Li, X., Wu, X., Tang, Q., Chang, T.-H., Peng, H., Rauscher, F.J., Ozato, K., and Zhu, F. (2011). Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.* 187, 4754–4763.

- Liu, B., Mink, S., Wong, K. a, Stein, N., Getman, C., Dempsey, P.W., Wu, H., and Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat. Immunol.* 5, 891–898.
- Liu, B., Yang, R., Wong, K. a, Getman, C., Stein, N., Teitell, M.A., Cheng, G., Wu, H., and Shuai, K. (2005). Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1113–1123.
- Mi, Z., Fu, J., Xiong, Y., and Tang, H. (2010). SUMOylation of RIG-I positively regulates the type I interferon signaling. *Protein Cell* 1, 275–283.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 240–273.
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918–1921.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev. Cell* 9, 769–779.
- Psakhye, I., and Jentsch, S. (2012). Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* 151, 807–820.
- Ran, Y., Liu, T.-T., Zhou, Q., Li, S., Mao, A., Li, Y., Liu, L., Cheng, J., and Shu, H. (2011). SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 283–292.
- Richard, P., Feng, S., and Manley, J.L. (2013). A SUMO-dependent interaction between Senataxin and the exosome, disrupted in the neurodegenerative disease AOA2, targets the exosome to sites of transcription-induced DNA damage. *Genes Dev.* 27, 2227–2232.
- Rowe, H.M., Jakobsson, J., Mesnard, D., Rougemont, J., Reynard, S., Aktas, T., Maillard, P. V, Layard-Liesching, H., Verp, S., Marquis, J., et al. (2010). KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature* 463, 237–240.
- Saitoh, H., and Hinchev, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* 275, 6252–6258.
- Sansonetti, P.J., and Mounier, J. (1987). Metabolic events mediating early killing of host cells infected by *Shigella flexneri*. *Microb. Pathog.* 3, 53–61.
- Shuai, K., and Liu, B. (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 593–605.

Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* *134*, 587–598.

Tempé, D., Vives, E., Brockly, F., Brooks, H., De Rossi, S., Piechaczyk, M., and Bossis, G. (2014). SUMOylation of the inducible (c-Fos:c-Jun)/AP-1 transcription complex occurs on target promoters to limit transcriptional activation. *Oncogene* *33*, 921–927.

Teytelman, L., Thurtle, D.M., Rine, J., and van Oudenaarden, A. (2013). Highly expressed loci are vulnerable to misleading CHIP localization of multiple unrelated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 18602–18607.

Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* *83*, 1091–1100.

Yang, Y.-G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* *131*, 873–886.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank A. Andrieux for technical assistance. This work was supported by grants from INCa, LNCC (Equipe labellisée), ANR and ERC 'SUMOSTRESS'. A.D. was supported by ENS and Odyssey-RE.

## **ACCESSION NUMBERS**

ChIPseq data were deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number XXXXX. Affymetrix data were deposited on ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under accession numbers XXXX, YYYY, ZZZZ

## **SUPPLEMENTAL INFORMATION**

Supplemental information include 6 figures and 11 tables.



## C. Perspectives

Le gène *Ifnb1* est un des gènes à la régulation la plus extensivement étudiée. Cependant, à notre connaissance, tous les travaux à ce jour se sont bornés à la séquence d'évènements intervenant au niveau de la région régulatrice proximale du gène, composée de quatre domaines PRD (Proximal Regulatory Domain). Nos travaux ont révélé trois nouvelles régions situées plusieurs milliers de paires de base en amont du gène, et qui semblent jouer un rôle important dans le contrôle négatif de l'expression du gène. L'accumulation de données, sur l'état de la chromatine, le recrutement de facteurs de transcription, et la mise en évidence d'une transcription locale induite de manière parallèle à celle du gène *Ifnb1* confère à ces régions un rôle putatif de régulateur intéressant.

Afin de démontrer l'importance de ces régions, il sera nécessaire de pousser plus loin les investigations. Notamment, l'inhibition de la transcription locale, par ARN interférence ou LNA (Locked Nucleic Acid) permettra de déterminer si la transcription locale a une importance dans la régulation du gène *Ifnb1*. Si au contraire, la transcription locale est une conséquence de la transcription du gène, le rôle de ces régions pourra être caractérisé en éditant le génome des cellules par des techniques telles que l'utilisation du système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Ce système constituera un outil adéquat pour caractériser le rôle régulateur de ces régions.

De plus, les régions « enhancers » sont capables de former des boucles avec les promoteurs. A l'aide de techniques dites « chromosome conformation capture » et dérivées, il sera intéressant de caractériser si le promoteur entre en contact, de manière dynamique ou non, avec chacune de ces régions.

Par ailleurs, la caractérisation du rôle de SUMO dans la fonction de ces domaines restera un défi majeur. S'il est acquis que SUMO joue un rôle répresseur sur la transcription, à la fois au promoteur et aux régions distales, son mode fonctionnement reste inconnu. Grâce à l'existence de données importantes sur la présence de certains facteurs de transcriptions, une approche candidat pourrait être envisagée afin de déterminer quel(s) est (sont) le (les) substrat(s) modifié(s) sur ces régions. L'identification des cibles de la SUMOylation, couplé à la caractérisation des régions, permettra de mieux disséquer le potentiel mécanisme régulateur à l'œuvre.

Enfin, des analyses bioinformatiques plus fines, ou dans d'autres types cellulaires, permettront d'identifier, s'ils existent, les autres gènes régulés de manière analogue.

## II. SUMOylation et cancer

### A. Préambule

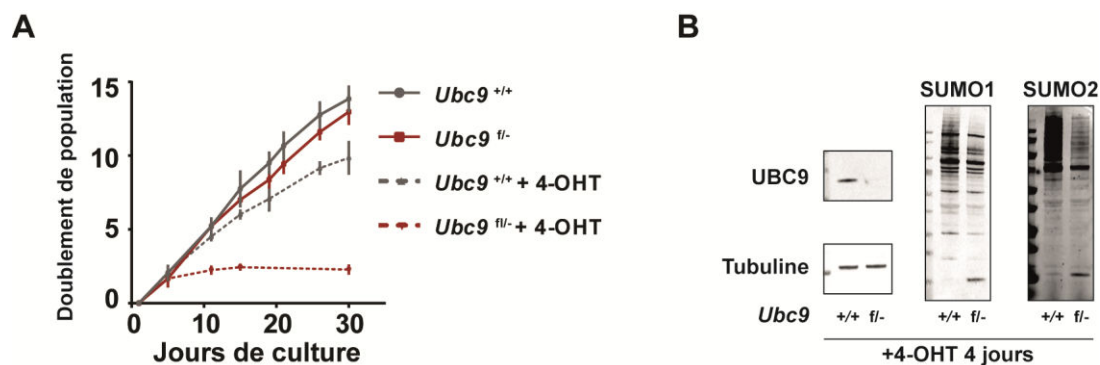
Les données de la littérature indiquent que la SUMOylation est intimement liée aux processus menant au développement de différents cancers. De plus, les travaux menés au laboratoire ont montré un rôle crucial de la SUMOylation dans l'homéostasie intestinale. Nous avons donc entrepris de caractériser les conséquences de la diminution de la SUMOylation sur les processus de transformation *in vitro* d'une part, et dans le cancer du côlon d'autre part. Ainsi, à l'aide du modèle murin de délétion inductible du gène codant pour l'enzyme *Ubc9*, nous montrons ici que la diminution drastique de la SUMOylation est plus délétère pour les cellules transformées que pour des cellules primaires. *In vivo*, les souris hétérozygotes pour *Ubc9* ont été utilisées pour étudier l'oncogenèse colorectale dans deux modèles complémentaires, l'un reposant sur la perte de la signalisation APC, l'autre sur la génération de mutations par un agent alkylant à tropisme colorectal. Si aucune différence n'a pu être observée entre les génotypes *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>+/-</sup>* dans le modèle APC, nous montrons que les souris hétérozygotes ont une charge tumorale réduite de moitié par rapport aux souris contrôles. De plus, nous mettons en évidence l'augmentation de l'expression d'UBC9 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, chez la souris et chez l'Homme. Enfin, nous montrons que l'expression de tous les acteurs de la voie SUMO est altérée dans des biopsies tumorales de patients atteints de cancer du côlon, constituant une signature permettant de distinguer les tissus sains et tumoraux. Les résultats obtenus *in vivo* suggèrent un rôle important de la SUMOylation dans le cancer du côlon, tandis que les résultats obtenus *in vitro* font de la SUMOylation une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de certains cancers.

### B. Résultats

#### a) La perte d'*Ubc9* bloque la prolifération cellulaire

La SUMOylation étant impliquée dans de multiples processus essentiels à l'homéostasie cellulaire, nous avons voulu déterminer les conséquences d'une réduction de celle-ci sur la prolifération. Pour cela, la collection de mutants d'*Ubc9* disponibles au laboratoire a été mise à profit. A partir de souris exprimant le transgène *Rosa26CreERT2*, permettant l'activation de

l'enzyme Cre-recombinase en présence de 4-hydroxytamoxifène, des fibroblastes embryonnaires murins *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>fl/-</sup>* ont été générés. L'allèle *Ubc9<sup>f</sup>* comprend deux séquences loxP de part et d'autres des exons 2 et 3 du gène, permettant leur excision et la génération d'un allèle non fonctionnel, ci-après noté *Ubc9<sup>-</sup>*, en présence de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) (décrits dans (Demarque et al., 2011)). Les cellules ont été passées tous les trois jours pendant 30 jours, et comptées à chaque passage, permettant la détermination de la vitesse de doublement de la population. Lors du premier passage, les cellules ont été traitées, ou non, avec du 4-hydroxytamoxifène, de manière permanente jusqu'à la fin de l'expérience. De manière surprenante, la perte d'un allèle d'*Ubc9*, bien que réduisant de moitié la quantité de protéine disponible, n'a aucun impact sur la prolifération des cellules *Ubc9<sup>fl/-</sup>* comparées aux cellules contrôles *Ubc9<sup>+/+</sup>*. En revanche, la perte totale d'UBC9 conduit à une forte déSUMOylation globale (Figure 17 B), et induit l'arrêt de la croissance des cellules *Ubc9<sup>-/-</sup>* (Figure 17 A). Ces résultats indiquent que seule la perte totale de la SUMOylation altère la croissance des fibroblastes embryonnaires murins primaires, et que celle-ci n'est pas modifiée par la réduction de moitié de la quantité d'UBC9 disponible.

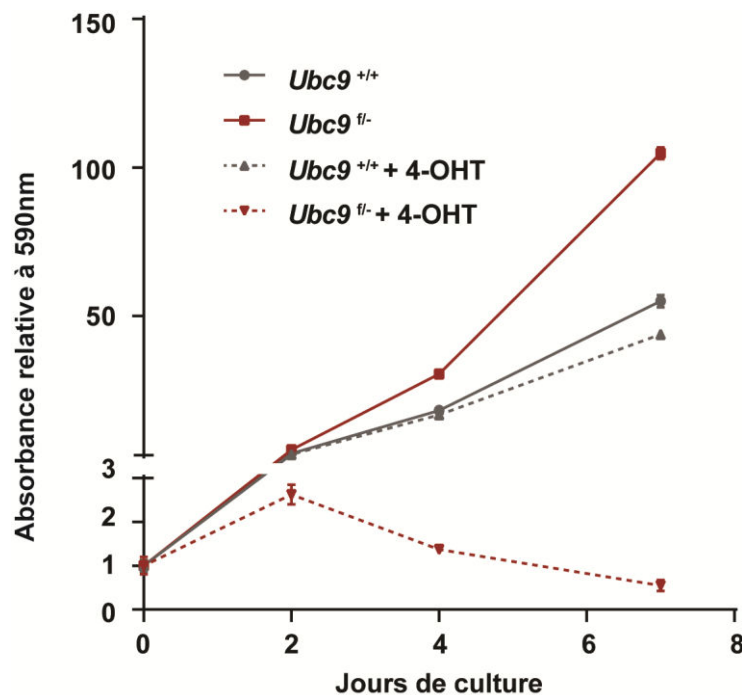


**Figure 17 L'inhibition de la SUMOylation provoque l'arrêt de la prolifération des MEFs. A :** Courbe de croissance des MEFs *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>fl/-</sup>*, en présence de 4-OHT ou non. Le 4-OHT a été ajouté lors du premier passage. Moyenne  $\pm$  écart-type. n=3. **B :** Western-blot pour UBC9, SUMO1 et SUMO2 dans les MEFs *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>fl/-</sup>* après 4 jours de traitement au 4-OHT. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

## b) La perte d'*Ubc9* affecte le processus de transformation par Ras oncogénique

Afin de déterminer si la réduction d'*Ubc9* perturbe le processus de transformation des fibroblastes, des lignées cellulaires ont été générées en infectant les MEFs *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>fl/-</sup> avec des rétrovirus codant pour l'antigène grand T du virus SV40 (SV40T) d'une part, et le mutant constitutivement actif de la protéine HRAS, HRASV12, d'autre part. La protéine SV40T permet l'immortalisation des cellules l'exprimant, en inhibant à la fois la voie Rb (Retinoblastoma protein) et la voie p53 (Tumor Suppressor p53), les deux composants principaux du contrôle de la senescence et de l'apoptose. La protéine HRASV12 permet quant à elle de transformer les cellules l'exprimant, en augmentant de manière constitutive les signaux de survie et de prolifération.

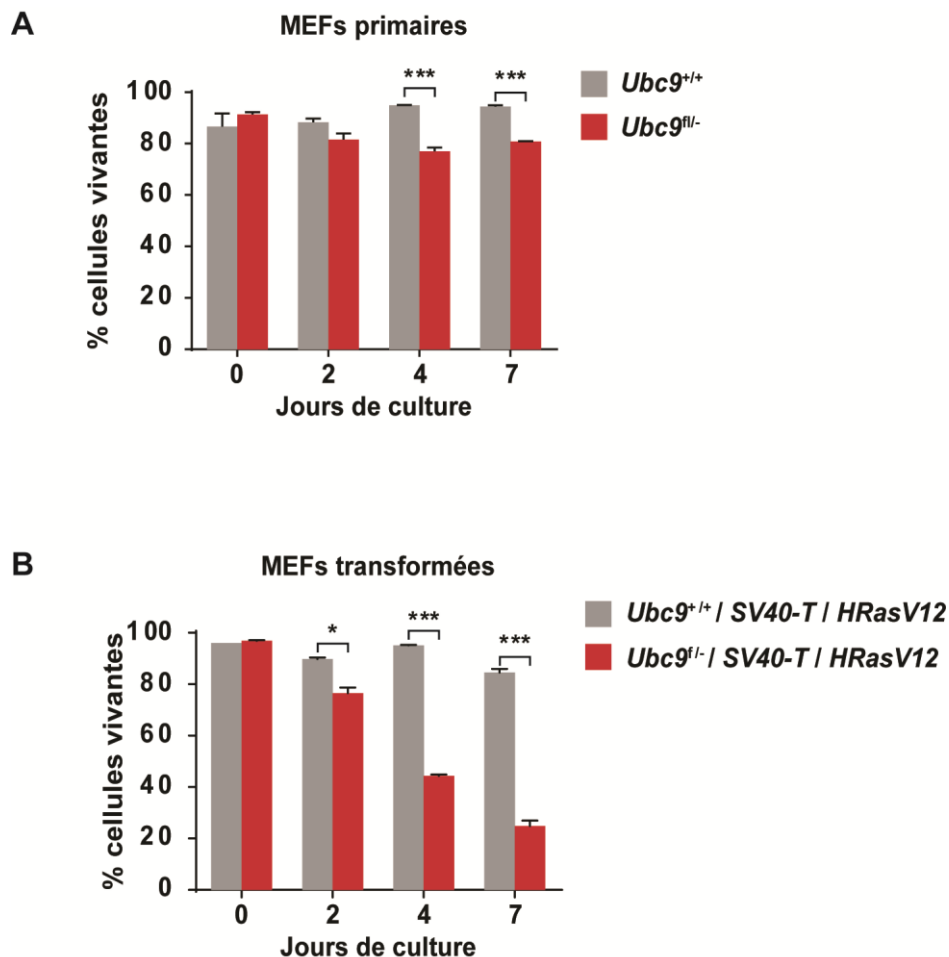
La prolifération à court terme des lignées cellulaires ainsi établies ont été analysées en fixant les cellules à différents temps suivants leur ensemencement, par coloration au Crystal Violet. Les cellules *Ubc9*<sup>fl/-</sup> semblent proliférer légèrement plus rapidement que les cellules *Ubc9*<sup>+/+</sup> en absence de tamoxifène. En revanche, la délétion d'*Ubc9* cause la mort rapide des MEFs transformées, celles-ci diminuant en nombre dès le quatrième jour de traitement (Figure 18).



**Figure 18** *Ubc9* est essentielle à la survie des cellules transformées par Ras oncogénique. Courbe de croissance sur 7 jours des MEFs transformées *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>fl/-</sup>, en présence de 4-OHT ou non. Moyenne ± écart-type. n=3.

### c) La SUMOylation est essentielle pour les cellules transformées

De plus, si les MEFs primaires *Ubc9<sup>f/-</sup>* présentent une légère baisse de viabilité (80% contre 95% des cellules contrôles *Ubc9<sup>+/+</sup>*) au 4<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jour de traitement (Figure 19 A), les MEFs transformées sont extrêmement sensibles à la perte d'*Ubc9*, comme le révèle une analyse de cytométrie de flux après un marquage dépendant de l'activation des caspases 3/7 et un marquage à la 7-aminoactinomycine D (7-AAD). En effet, on observe une baisse significative de leur viabilité dès le deuxième jour de traitement, celle-ci diminuant encore plus après le 4<sup>e</sup> et 7<sup>e</sup> jour, avec 42% et 25 % de viabilité, respectivement (Figure 19 B). Ceci montre que la perte d'*Ubc9* et de la SUMOylation qui en dépend à des conséquences beaucoup plus importantes sur la viabilité de cellules transformées par rapport à des cellules primaires. Ces résultats sont en accord avec ceux observés pour la prolifération.

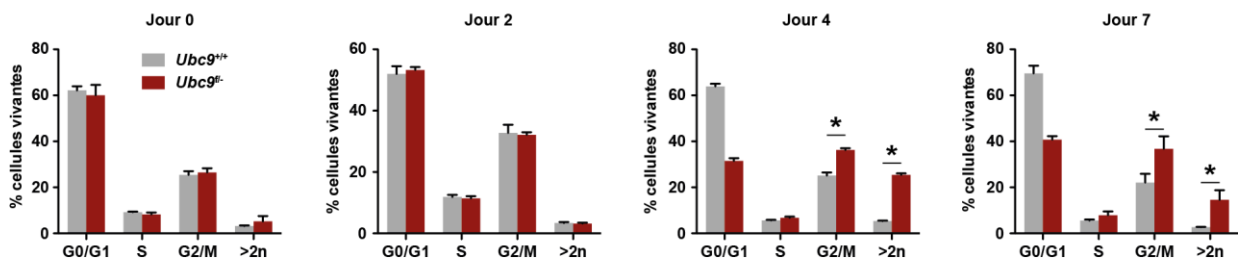


**Figure 19 Les cellules transformées sont plus sensibles à la perte d'*Ubc9* que les cellules primaires.** **A :** Viabilité des MEFs *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>f/-</sup>* primaires à différents jours de culture en présence de 4-OHT. **B :** Viabilité des MEFs *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>f/-</sup>* transformées à différents jours de culture en présence de 4-OHT. Moyenne  $\pm$  écart-type. n=3. \* p-value < 0,5. \*\*\* p-value < 0,001. Student t test.

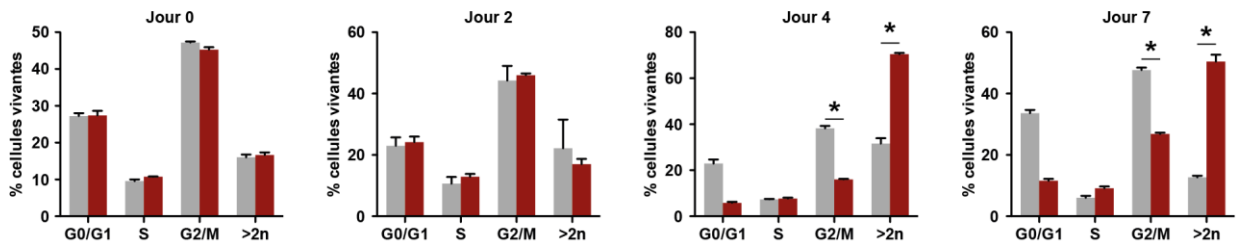
#### d) La perte d'Ubc9 affecte le cycle cellulaire

Les cellules dépourvues d'*Ubc9* n'étant plus capables de proliférer, nous avons souhaité caractériser leur cycle cellulaire afin de déterminer l'étape dans laquelle la SUMOylation est nécessaire. Avant le traitement au 4-OHT, les cellules *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>fl/-</sup> présentaient un état de cycle cellulaire identique, en accord avec nos données sur leur prolifération, (Figure 20 A, panneau de gauche). Si ce même profil était conservé après deux jours de traitement au 4-OHT, les résultats observés aux jours 4 et 7 de culture montraient une diminution des cellules en phase G0/G1, et une augmentation importante et significative de la proportion de cellules en phase G2/M, la proportion de cellules en phase S restant inchangée (Figure 20 A, panneaux de droite). Ceci suggère une incapacité des cellules à effectuer une mitose. De manière surprenante, une proportion significative des cellules (environ 20%) accumulait un génome de taille supérieur à 2n chromosomes. Ainsi, dans les cellules primaires, si la perte de SUMOylation peut provoquer une incapacité à entrer en mitose, elle semble cependant causer une réplication inappropriée menant à l'accumulation anormale d'ADN.

**A**



**B**



**Figure 20 Les cellules déficientes pour Ubc9 présentent un cycle cellulaire altéré. A :** Cycle cellulaire de MEFs *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>fl/-</sup> primaires après 0, 2, 4 et 7 jours de traitement au 4-OHT, déterminé par coloration à l'iodure de propidium. **B :** Cycle cellulaire de MEFs *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>fl/-</sup> transformées après 0, 2, 4 et 7 jours de traitement au 4-OHT, déterminé par coloration à l'iodure de propidium. Moyenne  $\pm$  écart-type. n=3. \* p-value < 0,5. Test de Mann-Whitney.

De plus, l'analyse du cycle cellulaire des cellules transformées par HRASV12 et SV40T (Figure 20 B) a permis l'observation de résultats concordants avec ceux obtenus pour les cellules primaires. Ainsi, la transformation provoque une augmentation du nombre de cellules en G2/M par rapport aux cellules primaires, en passant de 30% à 50%, indiquant une accélération de la prolifération. Par ailleurs, une proportion significative des populations acquière des génomes anormaux de taille supérieure à 2n chromosomes (15 à 20% dans les deux génotypes). Après quatre jours de traitement au 4-OHT, on observe une diminution à la fois des cellules en phase G0/G1 et G2/M et une augmentation significative des cellules arborant un génome supérieur à 2n chromosomes. Ceci indique que, comme pour les cellules primaires, la mitose est rendue impossible par la perte d'Ubc9, mais que la réplication est maintenue et mène à l'accumulation rapide de génomes aberrants par leur taille.

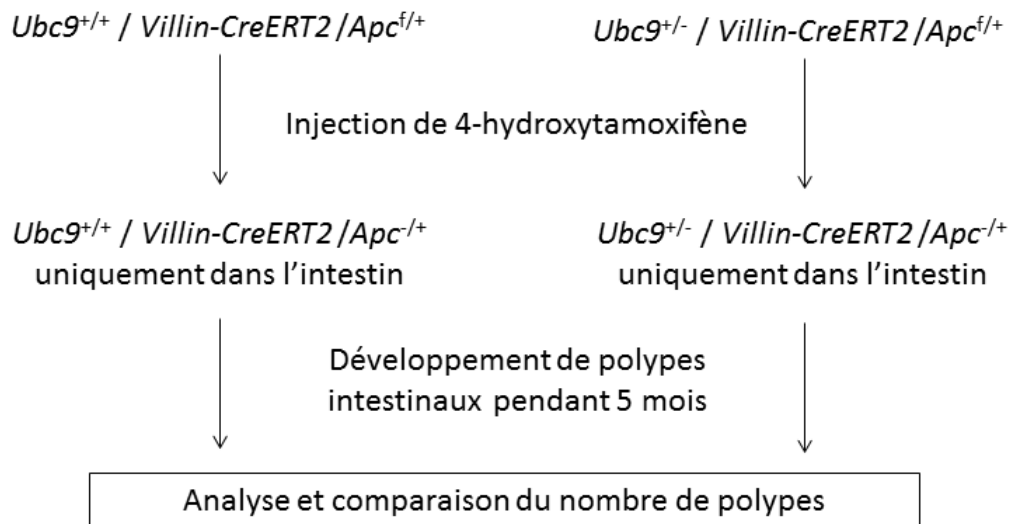
### e) *Ubc9* et le modèle APC de cancer colorectal

Afin d'évaluer le potentiel oncogénique des cellules hétérozygotes pour *Ubc9* *in vivo*, les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* ont été croisées avec un modèle de cancer intestinal inductible, reposant sur la délétion d'un allèle du suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli). L'importance démontrée de la SUMOylation dans l'homéostasie intestinale rend cet organe particulièrement intéressant pour l'étude de l'oncogenèse. La protéine APC est impliquée dans plus de 80% des cancers du côlon chez l'Homme (Kinzler and Vogelstein, 1996; The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Les individus porteurs de mutations de la lignée germinale pour le gène APC développent durant les premières décennies de leur vie une polypose adénomateuse familiale (PAF), se caractérisant par l'apparition de centaines voire de milliers de polypes pouvant évoluer vers le cancer du côlon (Groden et al., 1991; Joslyn et al., 1991; Kinzler et al., 1991; Nishisho et al., 1991). La protéine APC interagit avec de nombreux partenaires et exerce son rôle de suppresseur de tumeurs en régulant des processus cellulaires incluant la prolifération, l'apoptose, la différenciation, l'adhésion et la migration. Elle se situe au cœur de la signalisation Wnt, notamment en permettant la dégradation de la protéine  $\beta$ -catenin (CTNNB). La perte de fonction d'APC, par mutation ou troncature, entraîne notamment une accumulation de CTNNB, modifiant profondément le programme transcriptionnel de la cellule, et favorisant sa prolifération, sa survie, et sa dédifférenciation (McCartney and Näthke, 2008).

Le rôle majeur d'APC dans la carcinogenèse colorectal a influencé la création de nombreux modèles génétiques inactivant, la plupart du temps par délétion, la protéine (Zeineldin and Neufeld, 2013). Il est établi que de nombreux polypes se développent dans la partie distale de l'intestin grêle et dans le côlon des souris *Apc <sup>$\Delta$ 14/+</sup>* âgées de 5 mois (Colnot et al., 2004). La modification génétique de ces animaux consiste en la délétion de l'exon 14 du gène, crucial dans le rôle de suppresseur de tumeur d'APC. Cependant, le phénotype dommageable de ces souris les rendant difficiles à élever, nous avons croisé les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* avec des souris dont l'exon 14 du gène *Apc* est flanqué de séquences loxP (allèle *Apc<sup>fl</sup>*), et exprimant le transgène *CreERT2* sous l'influence du promoteur du gène *Villin*, spécifique de l'intestin. Ceci a abouti à la génération de souris *Ubc9<sup>+/-</sup> /Villin-CreERT2 /Apc<sup>fl/+</sup>*. L'allèle *Apc<sup>fl</sup>* a été décrit précédemment par Andreu *et al* (Andreu et al., 2005). L'injection de 4-hydrotamoxifène dans le péritoine des souris permet l'activation de la Cre-recombinase, exprimée uniquement dans l'intestin, et ainsi la recombinaison tissu-spécifique du gène *Apc*, recréant l'allèle *Apc <sup>$\Delta$ 14</sup>*. A partir de ces données, nous avons établi un protocole expérimental



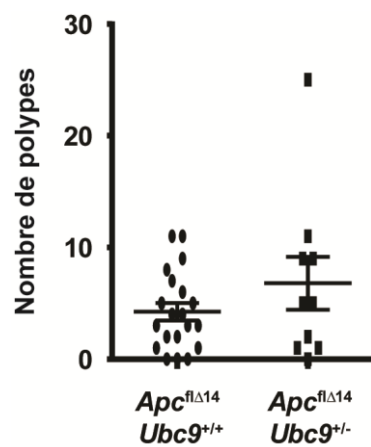
permettant l'obtention de polypes intestinaux dans les souris  $Apc^{fl/+}$ , en injectant le 4-hydroxytamoxifène à l'âge de 6 semaines, et en analysant l'intestin à l'âge de 5 mois (Figure 21).



**Figure 21 Schéma représentatif de la stratégie expérimentale utilisée pour étudier le rôle de la SUMOylation dans la carcinogenèse colorectale induite par la perte d'APC.**

L'analyse de l'intestin total des souris  $Ubc9^{+/+}/Villin-CreERT2/Apc^{fl/+}$  a permis de valider ce protocole. En effet, sur les 20 souris traitées, seules 3 étaient dépourvues de polypes intestinaux, avec une moyenne d'environ 5 polypes par souris. De même, l'analyse de l'intestin des souris  $Ubc9^{+/-}/Villin-CreERT2/Apc^{fl/+}$  a permis d'observer l'apparition de polypes chez 9 des 10 souris traitées, avec en moyenne 7,5 polypes par souris (Figure 22).

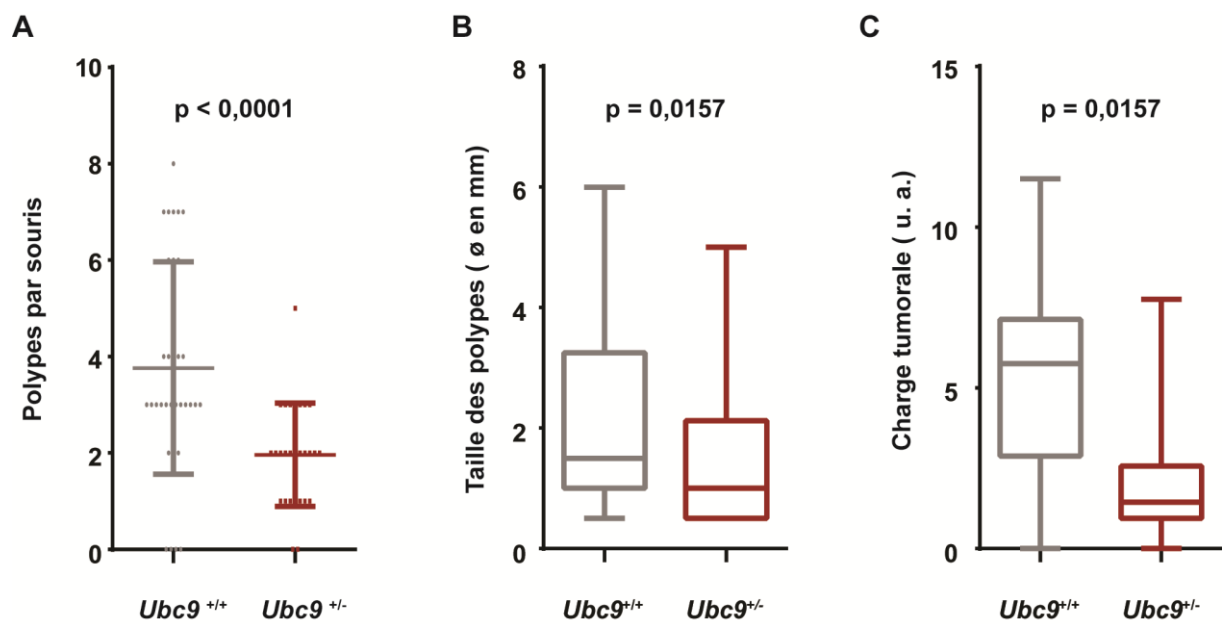
L'analyse statistique de ces résultats indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes, suggérant que la perte d'un allèle d'Ubc9 et la diminution de la SUMOylation associée ne provoquent pas de modification de la carcinogenèse colorectale dans ce modèle.



**Figure 22** L'hétérozygotie pour *Ubc9* n'a pas d'effet sur la carcinogénèse colorectale induite par la perte de l'exon 14 d'APC. Nombre de polypes dénombrés dans l'intestin total des souris  $Ubc9^{+/+}/Villin-CreERT2/Apc^{fl/+}$  et  $Ubc9^{+/-}/Villin-CreERT2/Apc^{fl/+}$ .  $n > 9$ .

#### **f) L'hétérozygotie pour Ubc9 diminue la sensibilité des souris à la carcinogenèse colorectale**

Si l'oncogenèse peut avoir des causes génétiques telles que la mutation d'*Apc*, elle peut également avoir une cause environnementale. Pour évaluer le rôle de la SUMOylation dans la carcinogenèse colorectale induite par un agent mutagène, nous avons injecté de l'azoxyméthane (AOM) à deux groupes de souris : les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* et les souris *Ubc9<sup>+/+</sup>* contrôles. L'azoxyméthane est un précurseur du MAM (MethylAzoxyMethanol), un agent alkylant de l'ADN, dont la lésion principale est la méthylation des nucléotides guanine (Delker et al., 1998). L'AOM a pour tropisme principal le colon, ce qui a rendu son utilisation très courante pour modéliser la carcinogenèse colorectale chez les rongeurs. L'injection hebdomadaire d'AOM pendant 6 semaines entraîne la formation de polypes principalement dans la partie distale du côlon six mois après le début du traitement. L'analyse des côlons de souris *Ubc9<sup>+/+</sup>* a permis d'observer l'apparition de 4 polypes par souris en moyenne. Les polypes présentaient un diamètre moyen de 2,1 mm. De manière intéressante, les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* portaient deux fois moins de polypes avec en moyenne 2 polypes par souris, dont le diamètre moyen était réduit à 1,6 mm (Figure 23 A,B). Ces différences qualitatives et quantitatives ont permis d'estimer une réduction de la charge tumorale de plus de 50% chez les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* comparées aux souris de type sauvage (Figure 23 C). Ces résultats suggèrent un rôle pour la SUMOylation favorisant l'oncogenèse colorectale d'étiologie environnementale.

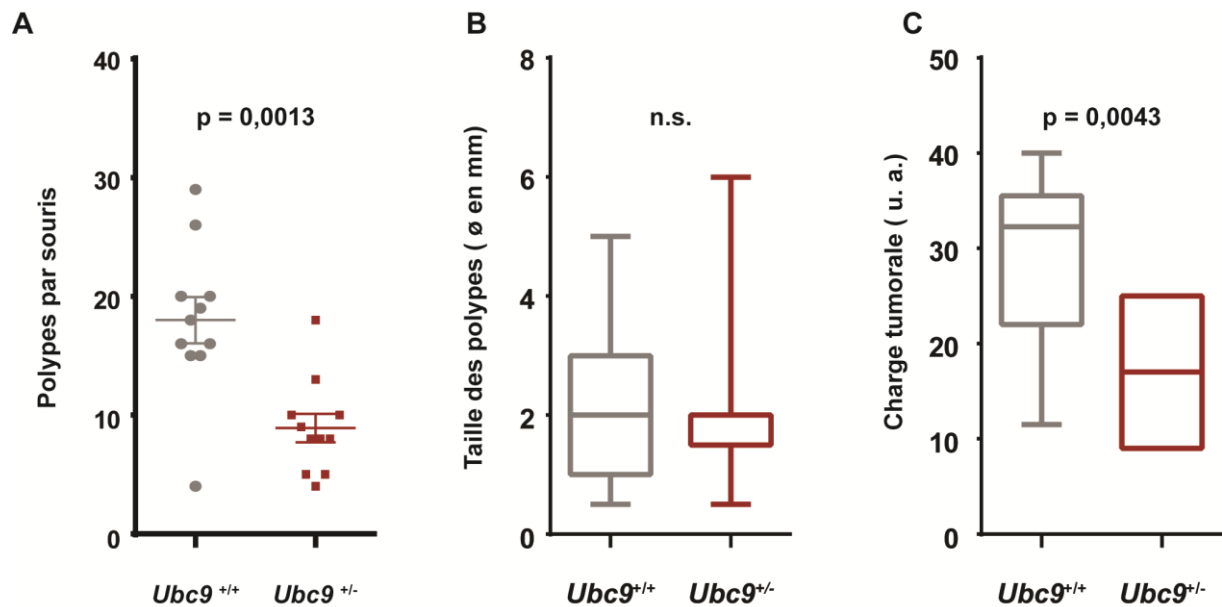


**Figure 23** L'oncogénèse colorectale induite par l'AOM est inhibée par la perte d'un allèle d'*Ubc9*. **A** : Nombre de polypes dénombrés dans les souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup> après le traitement AOM. Moyenne ± écart-type. n>23. **B** : Boîte à moustaches représentant la taille mesurée des polypes observés dans les souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup> après le traitement AOM. **C** : Charge tumorale par souris, estimée en ajoutant les diamètres des polypes mesurés. Les boîtes représentent la valeur médiane et les premier et troisième quartiles. Les moustaches représentent les premier et neuvième déciles. n > 23 souris. p-value : Test de Student.

**g) L'hétérozygotie pour Ubc9 diminue la sensibilité des souris à la carcinogénèse colorectale sur terrain inflammatoire**

L'intestin est également la cible de maladies inflammatoires chroniques telles la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, regroupées sous le terme MICI pour Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales. L'inflammation résultant de ces maladies créent un environnement favorable au développement d'adénomes voire d'adénocarcinomes. Ainsi, l'augmentation du risque de développer un carcinome colorectal (CCR) chez les patients atteints de MICI est largement reconnue depuis près d'un siècle (Andersen and Jess, 2013; Crohn and Rosenberg, 1925). A la lumière des résultats que nous avons obtenus et qui démontrent le rôle majeur de la SUMOylation dans le contrôle du programme transcriptionnel inflammatoire, ainsi que des résultats indiquant un rôle pro-tumoral de la SUMOylation dans un modèle de carcinogénèse colorectale chimio-induite, nous avons souhaité évaluer le rôle de la SUMOylation dans l'oncogénèse favorisée par l'inflammation.

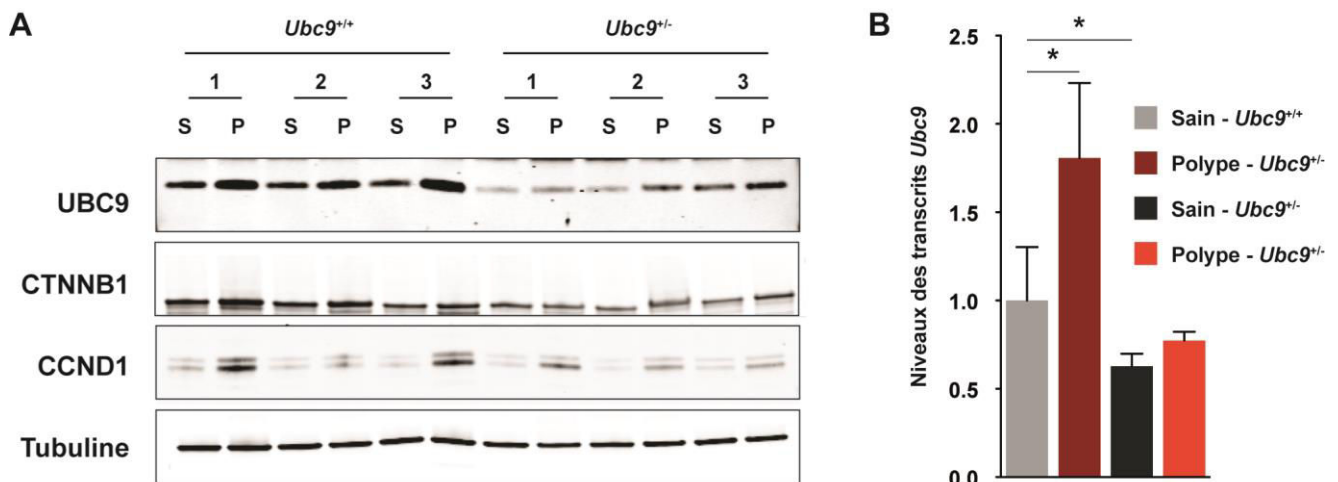
Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole consistant en l'injection unique d'une dose d'AOM à des souris *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>+/-</sup>*, suivie de trois cures d'une semaine de DSS (Dextran-Sulfate de Sodium) espacée de deux semaines de récupération. Les cures de DSS permettent l'installation d'une colite chronique par des lésions mécaniques de l'épithélium intestinal. Ce modèle est couramment utilisé et permet le développement de nombreux polypes chez la souris (Neufert et al., 2007). Ainsi, l'analyse des côlons des souris a permis d'observer une réduction de moitié du nombre de polypes se développant chez les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* par rapport aux contrôles, avec une moyenne de 8,9 polypes par souris contre 18 pour les *Ubc9<sup>+/+</sup>*, en accord avec les résultats obtenus pour le protocole utilisant l'AOM uniquement (Figure 24 A). En revanche, aucune différence n'a été observée concernant la taille des polypes (Figure 24 B). La charge tumorale est donc réduite de moitié pour les souris ne possédant qu'un seul allèle d'*Ubc9* (Figure 24 C). Ces résultats confirment un rôle important de la SUMOylation dans la carcinogénèse colorectale résultant de l'exposition à un agent alkylant, de surcroît sur terrain inflammatoire.



**Figure 24 L'oncogénèse colorectale induite par l'AOM sur colite est inhibée par la perte d'un allèle d'Ubc9.** **A** : Nombre de polypes dénombrés dans les souris  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  après le traitement AOM/DSS. Moyenne  $\pm$  écart-type.  $n > 23$ . **B** : Boîte à moustaches représentant la taille mesurée des polypes observés dans les souris  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  après le traitement AOM/DSS. **C** : Charge tumorale par souris, estimée en ajoutant les diamètres des polypes mesurés. Les boîtes représentent la valeur médiane et les premier et troisième quartiles. Les moustaches représentent les premier et neuvième déciles.  $n > 11$  souris.  $p$ -value : Test de Student.

## h) *Ubc9* est induit dans les polypes intestinaux

Les résultats précédents ayant établi que la diminution d'*Ubc9* perturbe l'oncogénèse colorectale chimio-induite, nous avons souhaité déterminer si la formation de polypes entraîne une modification du niveau total d'Ubc9. Pour cela, nous avons prélevé les polypes des souris ayant reçu le régime AOM/DSS, ainsi que le tissu sain à proximité, et nous en avons extrait les protéines et les ARN. La figure 25 présente les résultats obtenus pour trois souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et trois souris *Ubc9*<sup>+/-</sup>. De manière frappante, le niveau protéique d'UBC9 est fortement augmenté dans les polypes des souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> par rapport au tissu sain. En revanche, les polypes issus des souris *Ubc9*<sup>+/-</sup> ne parviennent pas à élever le niveau d'UBC9 à celui atteint dans les polypes de type sauvage (Figure 25 A). Pour contrôler la qualité de la dissection et la bonne séparation du tissu sain du tissu dysplasique, les détections de CTNNB1, stabilisée dans les tissus dysplasiques, et de la cycline D1 (CCND1), cible transcriptionnelle de la voie  $\beta$ -caténine, ont été réalisées, et ont permis de valider la dissection. L'analyse par RT-qPCR des transcrits d'*Ubc9* a confirmé cette observation au niveau transcriptionnel (Figure 25 B). Ceci indique d'une part que le niveau d'UBC9 est modulable et induit par la transformation cellulaire, et d'autre part qu'un seul allèle d'*Ubc9* ne peut pas être induit suffisamment pour compenser la perte du second allèle. Ce résultat renforce également un rôle important d'*Ubc9* dans la carcinogénèse colorectale.

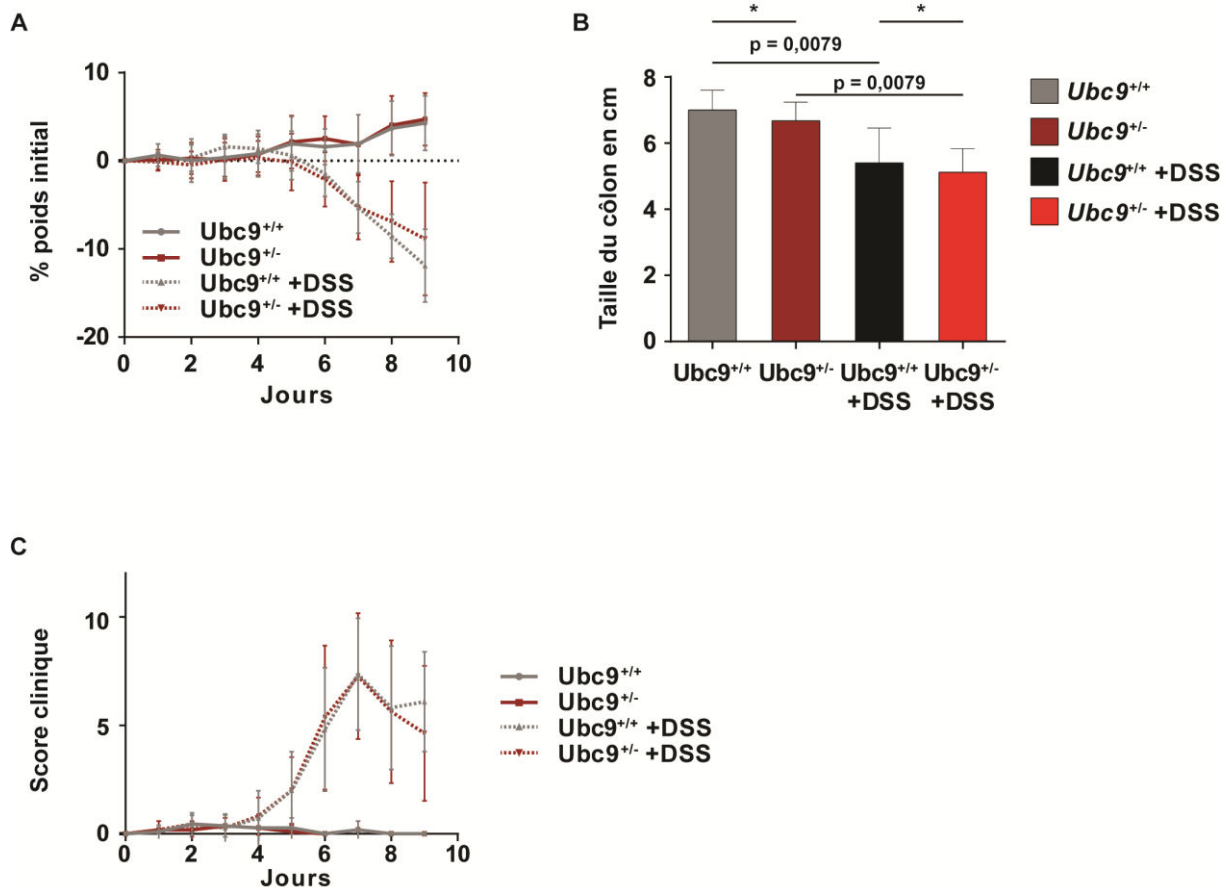


**Figure 25 UBC9 est induit au cours de la carcinogénèse colorectale chez la souris. A :** Western blots montrant le niveau d'expression d'UBC9, CTNNB1 et CCND1 dans les polypes prélevés chez trois souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup> et le tissu sain adjacent. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **B :** Analyse du niveau d'expression des transcrits d'*Ubc9* dans les polypes prélevés chez trois souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup> et le tissu sain adjacent. Les échantillons ont été normalisés par rapport à l'expression de *Gapdh*, *Hprt* et *Actb* puis rapportés à l'expression moyenne dans les tissus sains de souris *Ubc9*<sup>+/+</sup>. Moyenne  $\pm$  écart-type. n = 3. \* p-value < 0,05. Test de Mann-Whitney.

### **i) La perte d'un allèle d'*Ubc9* ne modifie pas la sensibilité au DSS**

Pour évaluer la composante inflammatoire du rôle favorable qu'exerce SUMO sur la carcinogenèse colorectale chimio-induite, le protocole de traitement des souris au DSS a été appliqué sans avoir recours à l'injection d'AOM. La sensibilité des souris a été testée à court et long terme. Le traitement par le DSS se traduit par une perte de poids, des diarrhées, et la présence de sang dans les selles. Le cumul de ces symptômes permet d'attribuer un score clinique à la gravité de la maladie causée par le traitement. Ainsi, une perte de poids située entre 1% et 5%, entre 5% et 10%, entre 10% et 15% et supérieure à 15% ajoute respectivement 1, 2, 3 et 4 points au score clinique. La consistance des selles, molles, liquides, ajoutent respectivement 2 et 4 points. Enfin, la présence de sang dans les selles, évaluée à l'aide du test Hemocult®, ajoute 2 points au score. L'observation visuelle de sang dans les selles, indicatrice d'un fort saignement, ajoute 4 points au score. En dépit du rôle avéré de la perte totale d'*Ubc9* dans l'inflammation, la perte d'un seul allèle n'a pas permis de déceler de différence de sensibilité au traitement par le DSS entre les souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup>. En effet, on observe une perte de poids et une évolution du score clinique similaires entre les deux groupes étudiés (Figure 26 A,C). De même, la mesure de la longueur du côlon après dissection, n'a pas permis l'observation d'une différence entre les groupes (Figure 26 B). En effet, la taille du côlon est un indicateur de l'état inflammatoire de celui-ci, avec un raccourcissement pour les souris traitées au DSS. Le raccourcissement observé est le même dans les deux groupes.

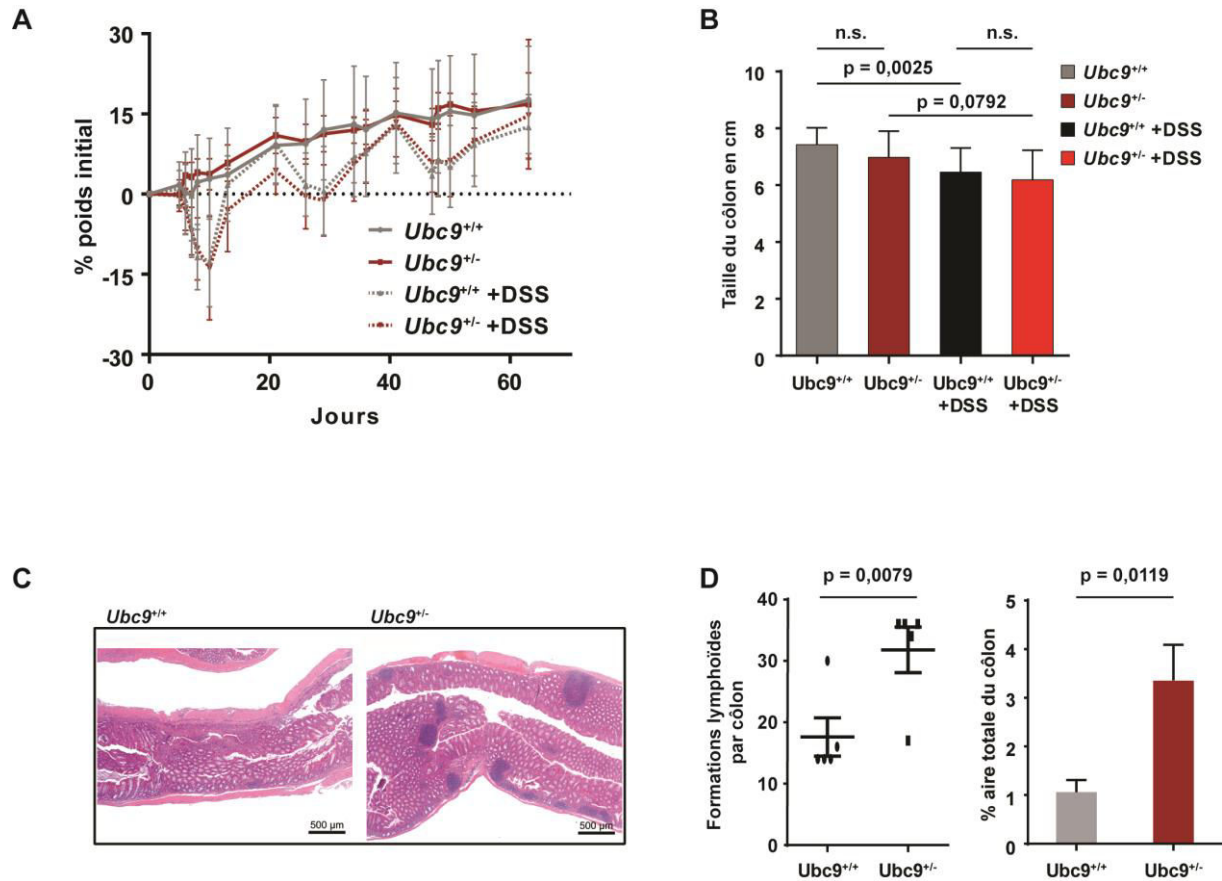




**Figure 26** Le DSS en cure aigüe provoque une colite similaire dans les souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup>. **A** : Suivi du poids des souris traitées ou non au DSS pendant 6 jours. **B** : Taille du côlon des souris traitées ou non au DSS pendant 6 jours suivies de 3 jours de récupération. **C** : Score clinique attribué aux souris traitées ou non au DSS pendant 6 jours. Moyenne  $\pm$  écart-type. n = 7. \* p-value < 0,05. Test de Student.

La sensibilité au DSS en cure aiguë étant similaire entre les deux groupes, nous avons évalué leur sensibilité à long terme, après installation d'une colite chronique suite à trois cures successives de DSS de 6 jours espacées de deux semaines. A nouveau, on observe une perte de poids importante à la fin de chaque cure, de manière semblable dans les deux groupes, suivie d'une récupération également identique (Figure 27 A). En fin d'expérience, l'analyse de la taille des côlons a permis d'observer une réduction équivalente de leur taille pour les souris *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>+/-</sup>* (Figure 27 B). En dépit d'un phénotype clinique similaire, l'analyse histologique des côlons de souris traitées de manière chronique a révélé un phénotype intéressant dans le cadre de la carcinogenèse colorectale. En effet, les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* présentent un nombre significativement supérieur de follicules lymphoïdes isolés comparées aux souris contrôles (Figure 27 C,D). Ces formations sont induites par l'inflammation, mais l'on connaît peu de choses quant à leur rôle dans la résolution de l'inflammation et dans le développement des dysplasies. Ainsi, ils seraient un marqueur de l'inflammation et corrèleraient avec une augmentation du risque de développer un cancer du côlon (Sipos and Muzes, 2011). Dans le cas de notre étude, cette corrélation n'est pas vérifiée.

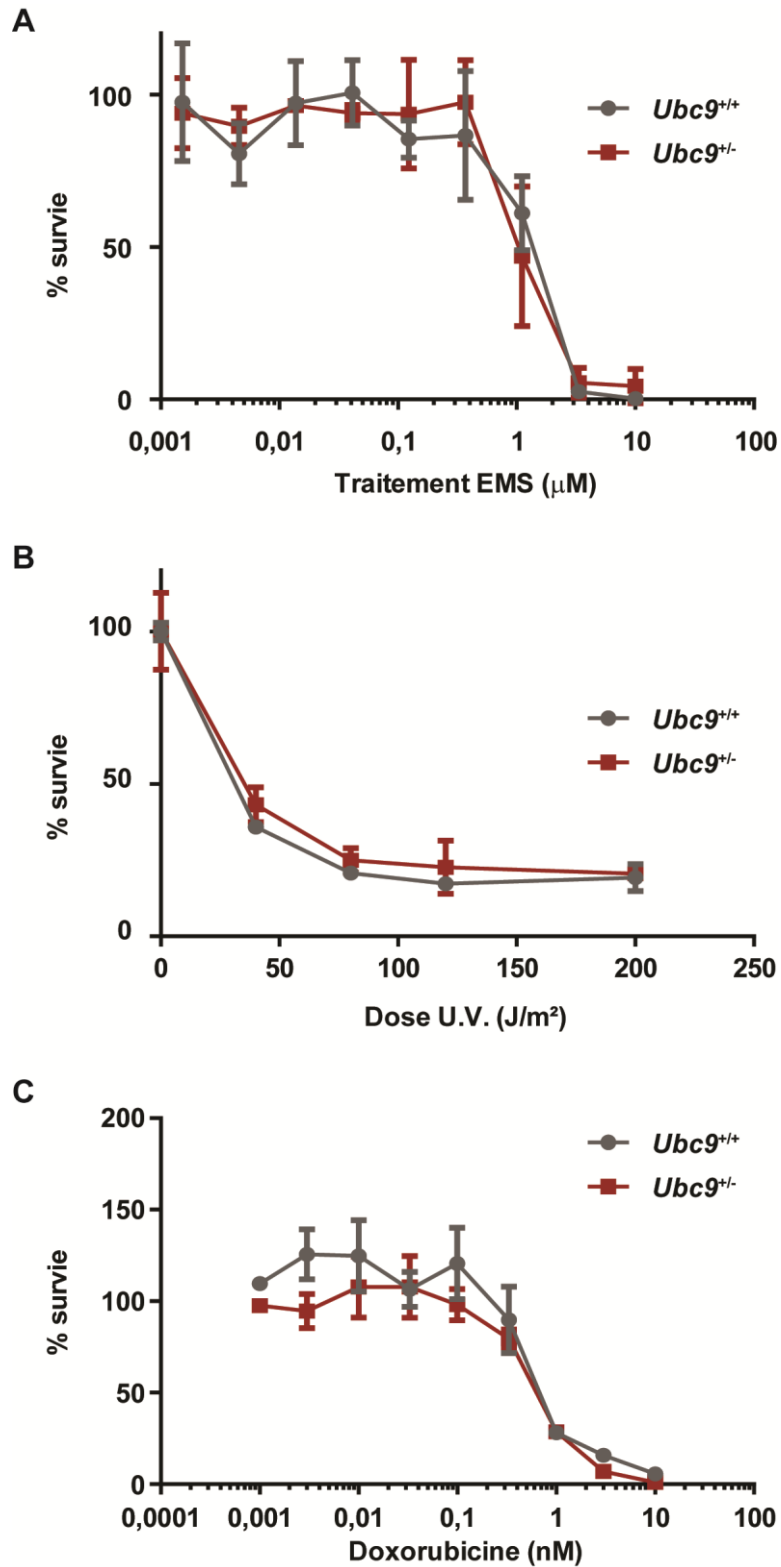
Ces résultats suggèrent que le DSS cause une colite de gravité comparable entre les deux groupes, et que celle-ci n'est donc pas modifiée par la perte d'un allèle d'*Ubc9*. La composante inflammatoire ne semble donc pas jouer un rôle déterminant sur la corrélation observée entre la diminution d'UBC9 dans l'organisme et la réduction de la sensibilité à la carcinogenèse colorectale chimioinduite.



**Figure 27 Le DSS en traitement chronique provoque une colite de gravité similaire dans les souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup>.** **A** : Courbes de suivi du poids des souris traitées ou non au DSS pendant 3 cures de 6 jours. **B** : Taille du côlon des souris traitées ou non au DSS 3 cures de 6 jours. **C** : Coupes histologiques représentatives de côlon de souris *Ubc9*<sup>+/+</sup> et *Ubc9*<sup>+/-</sup> traitées au DSS pendant 3 cures de 6 jours. Coloration HE. **D** : *Gauche* – Nombre de formations lymphoïdes comptées par côlon et par génotype étudié. *Droite* – Calcul de l'aire totale de la section occupée par les formations lymphoïdes. n = 5. p-value : Test de Student.

## **j) Sensibilité des cellules hétérozygotes pour *Ubc9* aux dommages à l'ADN**

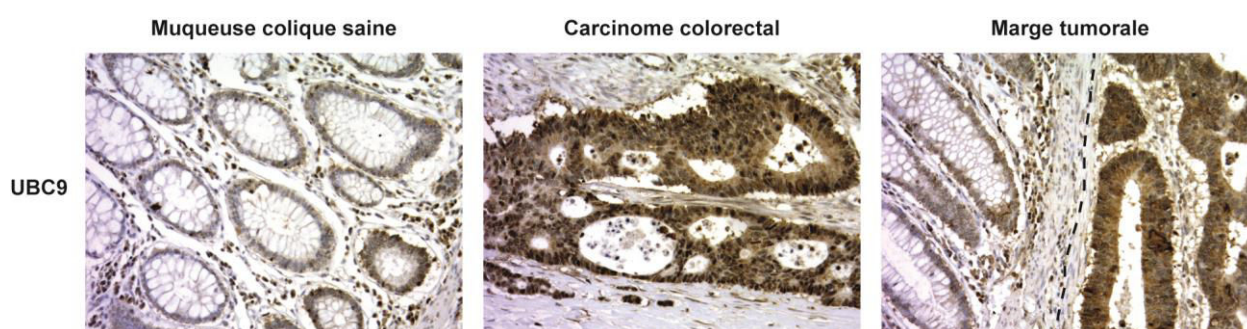
Nous avons alors émis l'hypothèse que la réduction de la SUMOylation pourrait avoir un impact sur la réponse aux dommages à l'ADN, ceux-ci étant la cause de l'initiation tumorale dans les modèles AOM et AOM/DSS. Comme nous l'avons déjà évoqué, il existe plusieurs rôles démontrés de la SUMOylation dans la réparation des dommages à l'ADN. Afin d'évaluer la capacité des cellules hétérozygotes pour *Ubc9* à réparer ces dommages, une étude préliminaire a été menée sur des MEFs primaires *Ubc9<sup>+/+</sup>* et *Ubc9<sup>+/-</sup>*. Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes d'EthylMéthaneSulfonate (EMS) (Figure 28 A), d'ultraviolet (UV) (Figure 28 B), ou de doxorubicine (Figure 28 C), traitement causant respectivement l'alkylation de l'ADN, la formation de dimères de thymine, ou des cassures double-brins. Après traitement, la viabilité des cellules a été évaluée. Aucune différence n'a pu être observée entre les deux génotypes, le traitement à l'EMS présentant une CL50 (Concentration Létale Médiane) d'environ 1µM, les UV environ 40 J/m<sup>2</sup>, et la doxorubicine environ 0,5nM. Ces résultats semblent indiquer que la sensibilité des deux génotypes à trois grandes catégories de dommages à l'ADN est similaire *in vitro*.



**Figure 28** Les cellules  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  présentent des sensibilités similaires à différents agents génotoxiques. **A** : Courbe dose-survie de MEFs primaires  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  traitées avec des doses croissantes d'EMS. **B** : Courbe dose-survie de MEFs primaires  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  traitées avec des doses croissantes d'ultraviolets (254nm). **C** : Courbe dose-survie de MEFs primaires  $Ubc9^{+/+}$  et  $Ubc9^{+/-}$  traitées avec des doses croissantes de doxorubicine. n = 3.

### k) La SUMOylation est induite dans les cancers colorectaux humains

Nous avons ensuite souhaité établir un parallèle entre les données observées chez la souris et celles observables chez l'Homme. Pour cela, le niveau protéique d'UBC9 a été testé par immunohistochimie (IHC) sur des biopsies de 120 patients atteints de cancer colorectal, ainsi que sur 30 biopsies de muqueuse colique saine, selon la technique du TMA (Tissue MicroArray). Cette technique consiste à regrouper de petites portions de tous les échantillons à observer sur la même lame d'IHC, permettant ainsi une coloration homogène inter-échantillons. De manière frappante, la grande majorité des tissus cancéreux présentent une forte coloration, à la fois pour UBC9 (76%) et pour SUMO-1 (90%). En revanche, les tissus sains présentent, au plus, une faible coloration pour UBC9 et moyen de la moitié (47%) présente un marquage fort pour SUMO-1 (Figure 29 et Table 8). Ceci indique que, comme dans les polypes de souris, la SUMOylation est fortement induite dans les tissus dysplasiques intestinaux humains.



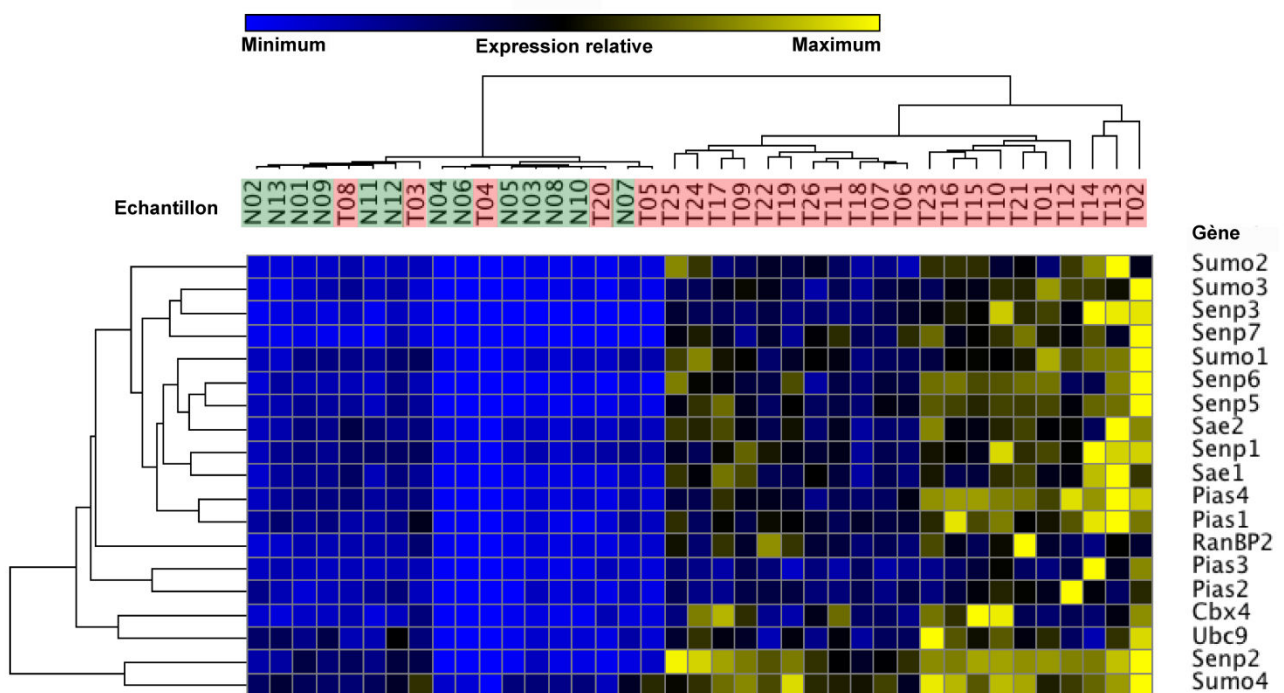
**Figure 29 UBC9 est fortement surexprimée dans les cancers colorectaux humains.** Vues représentatives des colorations immunohistochimiques d'UBC9 obtenues sur des biopsies de patients atteints de cancer colorectal. De gauche à droite, muqueuse colique saine, carcinome colorectal, et marge tumorale montrant dans sa partie gauche la muqueuse saine, et dans sa partie droite la zone tumorale. La ligne pointillée marque la séparation.

**Table 8 Répartitions des biopsies observées en immunohistochimie selon leur niveau d'expression d'UBC9 et SUMO1.**

Protéine	Tissu	Négatif ou faible expression	Expression modérée	Forte expression	Nombre de tissus analysés
UBC9	Tumoral	7 (6%)	22 (18%)	91 (76%)	120
	Sain	30 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	30
SUMO1	Tumoral	0 (0%)	12 (10%)	108 (90%)	120
	Normal	0 (0%)	16 (53%)	14 (47%)	30

## 1) Les profils transcriptionnels associés à la SUMOylation marquent les échantillons tumoraux

L'augmentation de la SUMOylation dans les tissus dysplasiques nous a orientés vers la réalisation d'un profil transcriptionnel associé à la SUMOylation dans les biopsies de cancers colorectaux et dans les tissus sains adjacents. Nous avons donc créé des amorces spécifiques des acteurs principaux de la SUMOylation, dont la liste est décrite dans la partie « Matériel et méthodes » de ce manuscrit. De manière surprenante par rapport aux données observées chez la souris, aucune augmentation des transcrits d'*Ubc9* n'a pu être observée en comparant les zones tumorales aux zones saines. En revanche, le clustering non-supervisé des échantillons étudiés, basé sur les niveaux d'expression des 17 acteurs de la voie SUMO analysés, a permis de fidèlement trier les échantillons entre les catégories « Tumeur » et « Non-tumeur » (Figure 30). Ceci confirme de manière très forte la perturbation de la voie SUMO dans le cancer colorectal, y compris au niveau transcriptionnel.



**Figure 30 Clustering non-supervisé de 26 échantillons tumoraux et 13 échantillons sains basé sur le niveau d'expression d'acteurs de la SUMOylation.** Les niveaux d'expression ont été déterminés par RT-qPCR. Les échantillons surlignés en vert sont les tissus sains, les échantillons surlignés en rouge sont les tumeurs.

## C. Discussion et perspectives

Les données collectées au cours de ce projet montrent que la SUMOylation n'est pas essentielle, à court terme, à la survie de fibroblastes primaires en culture, pour lesquels la perte d'*Ubc9* a pour conséquence une accumulation de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. L'importance de la SUMOylation pour la mitose a été mise en évidence chez la levure *S. pombe* par al-Khodairy *et al.* (al-Khodairy *et al.*, 1995). Ainsi la souche mutante pour *Hus5*, l'homologue d'*Ubc9*, présente d'importants défauts mitotiques. Depuis, l'apparition de défauts mitotiques chez des mutants présentant une SUMOylation déficiente, dans la plupart des organismes étudiés, a été décrite (Table 4). Ainsi, notre laboratoire a proposé que la létalité embryonnaire observée chez les souris *Ubc9*<sup>-/-</sup> était notamment imputable à d'importants défauts mitotiques (Nacerddine *et al.*, 2005). D'un point de vue mécanistique, SUMO se concentre au kinétochore pendant la mitose, où de nombreux substrats ont été identifiés (Wan *et al.*, 2012). Les résultats observés ici sont donc en accord avec le rôle crucial de la SUMOylation dans la mitose. Il est cependant intéressant de noter que ces défauts mitotiques ne provoquent pas d'augmentation majeure de la mortalité cellulaire. La suite du projet devra valider cette observation après une plus longue période de privation d'*Ubc9*.

A l'inverse, les cellules transformées par la protéine oncogène HRAS constitutivement activée présentent une forte sensibilité à la perte d'*Ubc9*. Ainsi, en seulement quatre jours, une mortalité importante par apoptose est observée, et une mortalité quasiment totale est observée après sept jours. Cette mortalité trouve probablement une de ses causes dans l'accumulation aberrante d'ADN. L'incapacité d'achever une mitose ne peut pas expliquer à elle seule l'accumulation d'ADN équivalent à plusieurs génomes. Ceci suggère donc un rôle pour la SUMOylation dans le contrôle de la réplication. De manière intéressante, Bonne-Andrea *et al.* ont montré récemment que la cycline E, qui contrôle l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire, est un substrat de SUMO2/3. En utilisant un système d'extraits cellulaires d'œufs de xénope, les auteurs ont montré que la SUMOylation de la cycline E est nécessaire au contrôle du nombre d'origines de réplifications actives. En effet, l'inhibition de la SUMOylation globale, et de la SUMOylation de la cycline E, induit une augmentation du nombre d'origines de réplifications activées, jusqu'à deux fois supérieur au nombre observé dans les conditions contrôles (Bonne-Andrea *et al.*, 2013). De plus, notre laboratoire a montré que l'activité E3 ligase de PIASy est nécessaire à la répression Rb-dépendante d'E2F, un



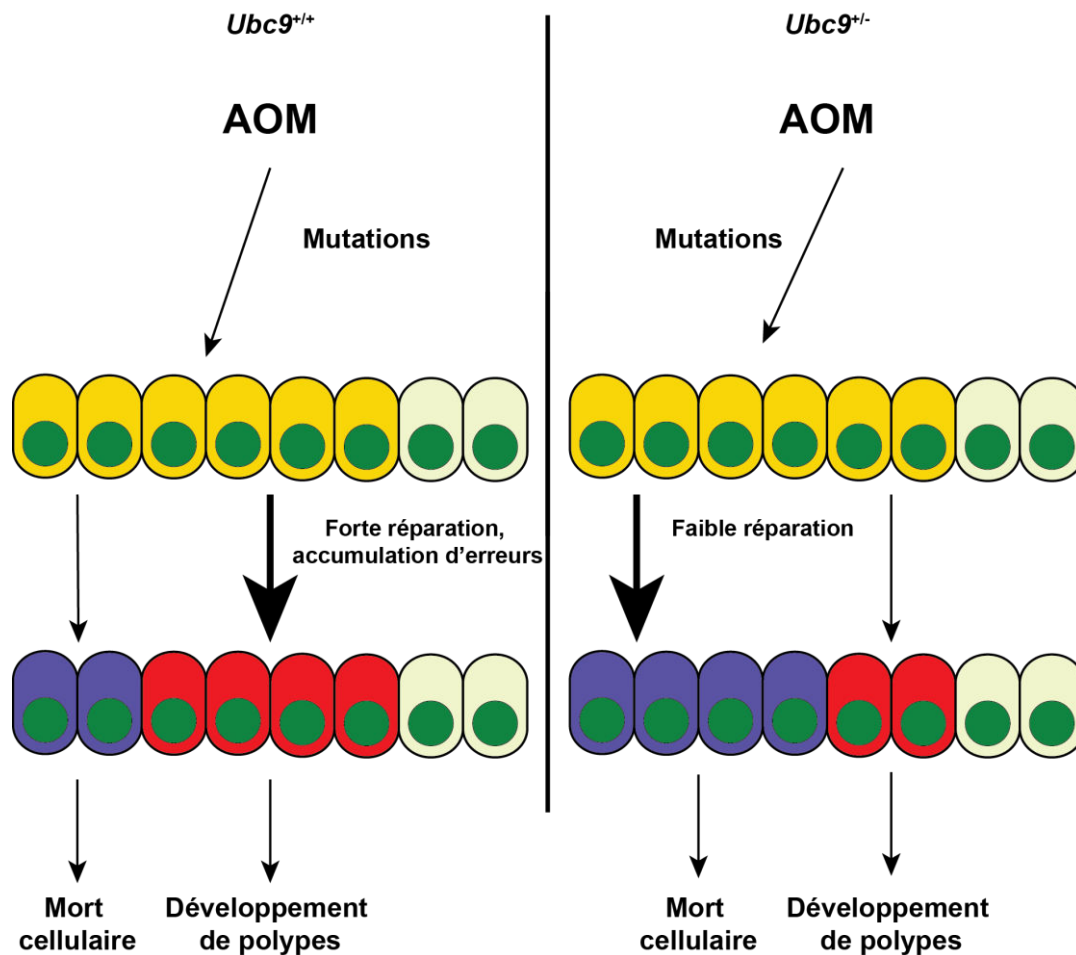
facteur de transcription essentiel à la progression du cycle de la phase G1 à S (Bischof et al., 2006). Ces deux mécanismes sont en accord avec les résultats observés dans les cellules transformées. Il sera intéressant de déterminer si l'expression des cibles transcriptionnelles d'E2F est supérieure dans les cellules déficientes pour *Ubc9* par rapport aux cellules contrôles. De même, une étude approfondie de l'activation des origines de réplication, utilisant par exemple l'incorporation de BrdU, et de l'activation de cycline E/CDK2, notamment par l'étude de la phosphorylation et dégradation de p27/KIP1, une des cibles du complexe, permettra d'avancer vers la validation de ces deux mécanismes dans notre modèle.

D'un point de vue thérapeutique, la différence de sensibilité à la perte de SUMOylation entre les cellules primaires et transformées permet d'entrevoir la possibilité d'une fenêtre thérapeutique. Il est important de noter qu'une létalité synthétique de SAE2, SAE1 et UBC9 avec MYC a été décrite récemment. Les auteurs mentionnent l'existence d'un programme transcriptionnel MYC- et SUMO-dépendant, enrichi pour des gènes impliqués dans la formation ou le maintien du fuseau mitotique. En effet, dans des cellules surexprimant MYC et dont l'expression de SAE2 est réduite par ARN interférence, les auteurs observent une altération du contenu en ADN des cellules, avec une accumulation de cellules en phase G2/M du cycle, et de cellules aneuploïdes (Kessler et al., 2012). Ces résultats sont similaires à ceux observés dans notre modèle. Nous proposons donc que la mortalité accrue des cellules transformées déficientes en SUMOylation par rapport aux cellules primaires est une caractéristique propre à leur état transformé, et non à la létalité synthétique de la voie SUMO avec un oncogène en particulier. De plus, et dans l'optique d'une éventuelle thérapie ciblant la SUMOylation, la mise au point d'un système génétique autorisant l'inactivation réversible de la SUMOylation permettrait de vérifier la réversibilité de l'arrêt du cycle dans les cellules primaires, après un blocage plus ou moins long. Si des inhibiteurs chimiques de la SUMOylation ont déjà été décrits, il n'existe cependant pas, à notre connaissance, d'études approfondies sur leur spécificité, ce qui empêche leur utilisation dans des systèmes cellulaires ou *in vivo*.

A l'aide de modèles animaux, nous avons observé une diminution de l'oncogenèse colorectale associée à un agent alkylant, l'azoxyméthane, chez les souris hétérozygotes pour *Ubc9*. En revanche, aucun phénotype significatif n'a pu être observé en utilisant le modèle génétique APC. De plus, la taille des polypes observés dans chacun des modèles n'était que très peu variable entre les deux génotypes. Ceci suggère que la perte d'un allèle d'*Ubc9* n'a pas de conséquence majeure sur la progression de l'oncogenèse colorectale. La réduction du

nombre de polypes observés dans les protocoles faisant intervenir l'AOM indique peut-être un rôle de SUMO dans l'initiation de l'oncogenèse, en modulant la réponse aux dommages à l'ADN, en l'occurrence la méthylation des nucléotides guanines. La réparation de ces dommages fait notamment intervenir le système d'excision de base, et la diminution de l'efficacité de ce système peut causer la mortalité cellulaire (Fu et al., 2012). La SUMOylation jouant un rôle dans la réparation d'ADN, on peut imaginer qu'une réduction dans la capacité de SUMOylation de la cellule entraîne une diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation des bases alkylées. Ceci aurait pour conséquence la mort des cellules touchées par l'agent alkylant, au lieu d'accumuler des mutations, diminuant ainsi le nombre de polypes (Figure 31). Les résultats préliminaires obtenus *in vitro* à l'aide de courbes dose/mortalité ne semblent pas en faveur de cette hypothèse. Cependant une analyse plus approfondie permettra peut-être de la valider.

Enfin, une accumulation d'UBC9 a été observée dans les dysplasies colorectales murines et humaines, ainsi qu'une dérégulation globale de la voie SUMO au niveau transcriptionnel dans les carcinomes colorectaux humains, soulignant l'importance probable de la SUMOylation dans ce type de cancer.



**Figure 31** Hypothèse de travail pour la diminution du nombre de polypes dans les souris hétérozygotes pour *Ubc9*. A gauche, l'AOM provoque des mutations dans les cellules intestinales des souris *Ubc9<sup>+/+</sup>*. Les mécanismes de réparation de l'ADN causent l'apparition d'erreurs, menant à la formation de polypes. A droite, les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* ne parviennent pas à réparer les mutations, les cellules touchées meurent et ne forment pas de polypes.

## Conclusion

La SUMOylation est un processus touchant de nombreux aspects fondamentaux de la vie de la cellule et dont la perturbation peut avoir des conséquences dramatiques sur les organismes. La localisation des centaines de substrats décrits à ce jour semble indiquer une importance particulière dans la biologie du noyau. Le noyau exerce des fonctions essentielles allant de la transmission de l'information génétique à travers les divisions cellulaires, à l'expression finement régulées des gènes importants pour le fonctionnement approprié des cellules. Ceci nécessite la mise en place de mécanismes permettant la préservation de l'intégrité du génome, la fidélité de sa reproduction, et le contrôle quantitatif et qualitatif de la transcription.

Dans ce contexte, d'autres laboratoires et le nôtre avons démontré l'existence d'un véritable paysage chromatinien de SUMO, et de nombreuses études ont montré que la SUMOylation de facteurs de transcription module leur activité transcriptionnelle. Un des objectifs des travaux décrits dans ce manuscrit était de caractériser les conséquences de la perte de SUMOylation sur le contrôle de la transcription induite, avec pour modèle l'activation d'un programme transcriptionnel par des signaux de danger, dans les cellules myéloïdes, en mettant l'emphase sur les cellules dendritiques inflammatoires. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une importante augmentation quantitative et qualitative de la transcription de ce programme, en accord avec la littérature présentant la SUMOylation comme un répresseur transcriptionnel. Cependant, grâce à l'invalidation génétique du gène codant pour le récepteur de l'IFN- $\beta$ , nous avons pu montrer que ce phénotype est majoritairement dû à la dérégulation du gène *Ifnb1*.

Cette observation pose plusieurs enseignements. Tout d'abord, la modification par SUMO des facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux signaux de dangers, tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 ou la famille des IRF, ainsi que de leurs régulateurs en amont, ne semble pas jouer un rôle critique dans leur activité, dans la mesure où les cellules invalidées à la fois pour *Ubc9* et pour *Ifnar1* présentent une activation de la transcription normale pour la plupart des gènes cibles. Ceci souligne l'importance de l'utilisation de modèles physiologiques pour confirmer ou infirmer les études biochimiques reposant sur la surexpression de mutants ou l'utilisation de vecteurs contenant des gènes rapporteurs. De plus, le nombre de sites de liaison de SUMO à la chromatine des cellules dendritiques est sans commune mesure avec le

nombre de gènes que nous avons trouvés dérégulés, ce qui semble indiquer qu'il n'existe pas une relation directe entre la liaison d'un promoteur par SUMO et le contrôle de la transcription du gène lié. Enfin, le contrôle négatif exercé sur le gène *Ifnb1* semble être au moins aussi complexe que le contrôle positif, et demandera un important travail pour être caractérisé.

Dans l'état actuel de nos travaux, nous pouvons expliquer l'augmentation de l'expression du gène *Ifnb1* par deux mécanismes différents. Le premier repose sur le contrôle de l'expression de rétrovirus endogènes par SUMO. L'augmentation de leur expression observée en absence d'*Ubc9* pourrait provoquer une réponse interféron de type I comme cela a déjà été décrit précédemment (Herquel et al., 2013; Stetson et al., 2008). Cependant, l'absence d'augmentation de l'expression d'autres interféron de type I, notamment l'IFN- $\alpha$ , rend peu probable cette hypothèse. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en croisant les souris mutantes pour *Ubc9* avec les souris invalidées pour STING, une protéine essentielle à l'activation de la voie de signalisation détectant la présence d'ADN cytoplasmique. De même, le croisement des souris mutantes pour *Ubc9* avec des souris mutantes pour *Mavs*, codant pour une protéine au carrefour de la signalisation déclenchée par la présence d'ARN viraux dans le cytoplasme, permettrait de tester cette hypothèse. Le second mécanisme repose sur la découverte de trois régions relativement éloignées en amont du promoteur du gène *Ifnb1* et que nous avons nommé USBD pour Upstream SUMO Binding Domain. Ces régions étaient, à notre connaissance, inconnues jusqu'ici, et présentent des caractéristiques intéressantes de régions régulatrices, incluant la liaison de nombreux facteurs de transcription, une hypersensibilité à la DNase, des modifications d'histones, et une transcription inductible. La liaison de ces régions par SUMO, et la dérégulation du gène le plus proche en son absence, laissent entrevoir un rôle potentiel de SUMO dans certains enhancers.

Afin de tester l'importance de ces régions dans la régulation du gène *Ifnb1*, il sera intéressant de créer des lignées cellulaires dont le génome aura été édité pour ne plus les contenir. L'inhibition de l'expression des séquences transcrites par ARN interférence ou par l'utilisation de LNA (Locked Nucleic Acids) permettra également de tester l'importance de la transcription au niveau de ces loci.

Le second objectif des travaux décrits ici était l'évaluation des conséquences de la perte de la SUMOylation sur l'initiation et la progression du cancer, avec l'utilisation de modèles cellulaires et de modèles de carcinogenèse colorectale *in vivo*. Un nombre important d'études chez l'Homme montrent que la SUMOylation est souvent augmentée dans différents cancers.

Nous montrons ici que c'est également le cas dans le cancer colorectal. Ceci suggère que la SUMOylation est un phénomène important pour les processus menant au cancer. Nos résultats *in vitro* suggèrent pour leur part que l'importance de la SUMOylation dans le cancer est liée à la mitose et au contrôle de la réplication, deux processus fondamentaux essentiels à la vie de la cellule. De plus, les résultats obtenus dans les différents modèles de cancer du côlon utilisés confirment un rôle important pour la réparation de l'ADN.

Les deux projets développés durant cette thèse ouvrent des perspectives importantes. En effet, et contrairement à ce qui était admis auparavant, ces travaux montrent que la perte de SUMOylation peut ne pas être fatal à une cellule différenciée, telles que les cellules dendritiques, ou à une cellule non-transformée, telles que les fibroblastes primaires. Cette observation est importante puisqu'elle révèle que la modulation de la SUMOylation peut avoir une toxicité acceptable. Ceci ouvre la porte à l'étude des conséquences de la perte de la SUMOylation dans d'autres tissus, à l'aide par exemple de souris exprimant la Cre-recombinase de manière tissu-spécifique. On peut ainsi imaginer une étude à grande échelle évaluant l'importance de la SUMOylation dans chaque tissu de l'organisme. De plus, cela ouvre de potentielles opportunités thérapeutiques, dans les domaines du cancer, des maladies inflammatoires, et sans nul doute d'autres pathologies pour lesquelles le rôle de SUMO reste à caractériser.

Enfin, le rôle principal de SUMO à la chromatine reste un mystère. Ces dernières années ont vu se multiplier les études à grande échelle du paysage chromatinien de SUMO et de l'indexation de ses substrats sous diverses conditions de culture cellulaire. Ces travaux et les nôtres mettent en doute la capacité de SUMO à contrôler de manière directe la transcription, et semblent plutôt lui attribuer un rôle de maintenance globale du noyau, avec des fonctions majeures impliquées dans la mitose, la réplication et la réparation de l'ADN.

## Matériel et méthodes

Ici sont décrites les procédures expérimentales non-décrites dans la section « Materials and methods » de l'article.

### Culture cellulaire

Les fibroblastes embryonnaires murins ont été obtenus à partir d'embryons à jour E12.5, puis cultivés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10UI/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal, à 37°C, dans une atmosphère humidifiée comprenant 5% de CO<sub>2</sub> et 20% d'O<sub>2</sub>. Lorsqu'indiqué, 100µg/ml de 4-hydroxytamoxifène ont été ajouté au milieu de culture.

### Prolifération cellulaire

Les MEFs sontensemencées à 5.10<sup>5</sup> cellules par boîtes de 75cm<sup>2</sup> et trypsinées et comptées tous les 3 à 4 jours, puis réensemencées à 5.10<sup>5</sup> cellules par boîtes. Le doublement de population est calculé en utilisant la formule :

$$\text{Doublement} = ( \text{Log}(\text{nombre à jour J}) - \text{Log}(\text{nombre ensemencé}) ) \times 3,32$$

Alternativement, pour les tests de prolifération sur de courtes périodes, la méthode du Crystal Violet (ci-après) est utilisée. Les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à 1.10<sup>5</sup> cellules par puit, puis fixée pendant dix minutes dans de la formaline 10% pH 7 après le nombre de jours indiqués.

### Courbes dose-mortalité

L'évaluation de la toxicité de traitement induisant des dommages à l'ADN a été réalisée selon la méthode du Crystal Violet. En plaque six puits, en triplicats, 1.10<sup>5</sup> cellules ont étéensemencées puis traitées avec l'agent génotoxique. A l'issu de 72h de culture, les cellules ont été fixées pendant dix minutes dans de la formaline 10% pH 7, lavées, puis colorées par une solution de Crystal Violet 0,01% pendant dix minutes à température ambiante. Après lavage extensif, le Crystal Violet piégé dans les membranes cellulaires a été solubilisé par 1ml d'acide acétique 10%. Le nombre relatif de cellule par puit a alors été extrapolé à partir de l'absorbance à 590nm.

## **Production virale et infection**

Au premier jour  $4,5 \cdot 10^5$  cellules Phoenix ont été ensemencées en boîtes de 10 cm. Le lendemain, après avoir changé leur milieu pour un milieu DMEM complété en chloroquine  $25 \mu\text{M}$ , les cellules Phoenix (HEK293T modifiées pour la production de rétrovirus à tropisme murin) ont été transfectées au phosphate de calcium par la combinaison de  $10 \mu\text{g}$  d'ADN rétroviral,  $61 \mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2M dilués dans  $500 \mu\text{l}$  d'eau stérile et de  $500 \mu\text{l}$  de HBS 2X, incubés 30 minutes à température ambiante. Les cellules transfectées ont ensuite été incubées sur la nuit en étuve à  $37^\circ\text{C}$ . Le même jour,  $4,5 \cdot 10^5$  cellules cibles à infecter ont été ensemencées en boîtes de 10 cm. Les deux jours suivants, toutes les 3h et à 4 reprises, le surnageant des cellules Phoenix a été prélevé, filtré à  $0,45 \mu\text{m}$ , supplémenté avec  $4 \mu\text{l}$  de polybrène 1000X ( $8 \text{mg/ml}$ ) puis appliqué sur les cellules cibles dont le milieu a préalablement été aspiré. Enfin, l'antibiotique permettant la sélection (puromycine  $4 \mu\text{g/ml}$  ou hygromycine  $100 \mu\text{g/ml}$ ) a été ajouté et maintenu jusqu'à l'observation de la mortalité complète des cellules contrôles non-infectées.

## **Cytométrie**

La viabilité des cellules a été évaluée à l'aide du kit « Cell viability assay » de Millipore basé sur le marquage dépendant de l'activation des caspases 3/7 et un marquage au 7-aminoactinomycine D (7-AAD) conformément aux indications du fabricant. Les cellules marquées ont été analysées sur la machine « MUSE cell analyzer » de Millipore, en acquérant 10 000 évènements.

Le cycle cellulaire a été analysé à l'aide du kit « Cell cycle » de Millipore basé sur le marquage à l'iodure de propidium, conformément aux indications du fabricant. Les cellules marquées ont été analysées sur la machine « MUSE cell analyzer » de Millipore, en acquérant 10 000 évènements.

## **Immunodétection après transfert sur membrane**

Les extraits protéiques de cellules en culture ont été réalisés en lysant les cellules directement dans le tampon de Laemmli contenant 2% de SDS, 10% de glycérol, 60mM de Tris-HCl pH 6,8 et 0,01% de bleu de bromophénol. Les extraits protéiques de tissus ont été obtenus en immergeant le tissu dans du tampon RIPA (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 0,1% sodium deoxycholate, 140mM NaCl, 10mM N-Ethylmaleimide et inhibiteurs de protéases « Complete EDTA-free » de Roche), dans des tubes « Lysing Matrix D » de MP Bio. Les tissus ont été lysés en plaçant les tubes



dans la machine « FastPrep24 » de MP Bio, pendant 6 cycles de 30 secondes à puissance maximale, entrecoupés de 5 minutes de repos sur glace. Les échantillons ont par la suite été dosés à l'aide du kit « DC protein assay » de Bio-Rad, puis repris dans le tampon Laemmli. Tous les extraits protéiques ont été soniqués et incubés 5 minutes à 95°C avant dépôt sur gel de polyacrylamide pour séparation par électrophorèse, et transfert sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été bloquée dans le lait 5%, incubée en présence des anticorps primaires indiqués puis en présence d'anticorps secondaires spécifiques couplés à des fluorophores permettant la détection par le système infrarouge Odyssey.

### **Anticorps**

Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'immunodétection après transfert sur membrane : anticorps monoclonal de lapin contre UBC9, clone EP2938Y, anticorps monoclonal de lapin contre CTNNB1 clone D10A8, anticorps monoclonal de lapin contre CCND1, clone 92G2, anticorps monoclonal de souris contre l'alpha-Tubuline, clone B-5-1-2, anticorps monoclonal de lapin contre SUMO-1, clone Y299, anticorps monoclonal de souris contre SUMO-2, clone 8A2. Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'immunohistochimie : anticorps polyclonal de chèvre N-15 contre UBC9 (sc-5231 – Santa Cruz BioTech), anticorps polyclonal de lapin contre SUMO1 (produit au laboratoire).

### **RT-qPCR**

Les ARN totaux ont été extraits de 1.106 cellules en culture lysées dans 1ml de TRIzol, et les ARN totaux de tissus ont été extraits en immergeant le tissu prélevé dans 1ml de TRIzol dans des tubes « Lysing Matrix D » de MP Bio. Les tissus ont été lysés en plaçant les tubes dans la machine « FastPrep24 » de MP Bio, pendant 6 cycles de 30 secondes à puissance maximale, entrecoupés de 5 minutes de repos sur glace. Après la lyse des tissus ou des cellules, les ARN ont été récoltés dans la phase aqueuse séparée par l'ajout de 1-bromo-3-chloropropane, puis précipités dans l'isopropanol, lavés et resuspendus dans l'eau « Nuclease-free ». L'ADN génomique résiduel a été éliminé en utilisant le kit « DNA-free » d'Ambion en suivant les instructions du fabricant. Les cDNA ont été synthétisés à l'aide du kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » d'Applied Biosystem. Les qPCR ont été réalisées sur une machine CFX96 de Bio-Rad, en utilisant le « PowerSYBR » d'Applied Biosystem.

## Amorces de qPCR

Les amorces suivantes ont été utilisées pour les qPCR chez l'Homme :

Amorce	Sequence (5'->3')
CBX4F	TGCCAGCTGTTGGCGAGCAC
CBX4R	ACTCCACTCTGCCCTTGCGGA
PIAS1F	GCGGACAGTGCGGAACTAAAGCAAA
PIAS1R	TCTCCCGGCGTAGCCCAACA
PIAS2F	GCCTGGCAGAGACAAGTTGCC
PIAS2R	CGGTGGTGCATAGCCAGGCAAA
PIAS3F	CGGCCACCACCCTTGCATC
PIAS3R	GCTGCACTTGCTGGGGTGTGA
PIAS4F	TACTGCTCCGTCCCGGGCTAC
PIAS4R	GAGGTTGATGGGGCGGCACG
RanBP2F	ACTCCACAAAGGGCCCAGTC
RanBP2R	TGCACTGGCGGTGTGTGCAT
SAE1F	TGGGTATTAGTCCTGACCTGCTTCC
SAE1R	CGCTGAGACAGGGCCTTCACAAT
SAE2F	ATGCCCCGAAAAAGTGGGGC
SAE2R	TGCTCTTGAGCTGTGGAGGTGGA
SENP1F	CGAGCACGAGAAAGATTGCGCC
SENP1R	TCCCGCTCCTGCAATCTCTGGT
SENP2F	GCTGCTGCTTGGGCCTGGTAT
SENP2R	AACAGAGTGCTGTCTGAGCGCC
SENP3F	CCGCTCCCGGGTACTGGAAGAT
SENP3R	GGGGCCAACGAAGACGCTCC
SENP5F	GAGCTGACGAAGGCGGGGTC
SENP5R	TGGATGCAGCTGCTACCCTCGT
SENP6F	GCCCAAAGCAGTCTGGACCGA
SENP6R	ACGTTCAACACCTTGGAGCCGA
SENP7F	ACCCACCTGTAAGTGAAGGAAAGT
SENP7R	ACTTCGTTGTGAGCCCCTTTCAGA
SUMO1F	TCTGCTTACCCGAGGCCGCT
SUMO1R	TCCCCAAGTCCTCAGTTGAAGGT
SUMO2F	TGGCGGGGCAGGATGGTTCTG
SUMO2R	TCTGCCTCATTGACAAATCCCTGTCTG
SUMO3F	GCGAGAGGCAGGGCTTGTCA
SUMO3R	CTCCGGCACACCTCCCGTCT
SUMO4F	GGTGGCGGGACAGGATGGTTC
SUMO4R	TGTTCCACTGATTGGTTGCCAC
UBC9F	GGACCTGTGGCTGGAGAGGGAC
UBC9R	TTCCTCTCCTGGGCGAGTCTGC
BC002942F	GTTGTAGTTGCCGGTGATGA
BC002942R	GTGGCCACCTTCCTAATTGA
HBMS164F	GGCAATGCGGCTGCAA
HBMS164R	GGGTACCCACGCGAATCAC
TRIM44F	AGGCAGCTCATCTGTGCCT
TRIM44R	GATCATAGCGGCCTTCAGTC

Les gènes de ménage *Bc002942*, *Hbms164* et *Trim44* ont été utilisés comme référence pour les calculs des  $\Delta Ct$ .

Les amorces suivantes ont été utilisées pour les qPCR chez la souris :

Amorce	Séquence
mGAPDHs	TGA CGT GCC GCC TGG AGA AA
mGAPDHs	AGT GTA GCC CAA GAT GCC CTT CAG
mHPRTs	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G
mHPRTas	GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C
mACTBs	ATG AGC TGC CTG ACG GCC AGG TCA TC
mACTBas	TGG TAC CAC CAG ACA GCA CTG TGT TG
mUbc9s	CTATCCAAGCCAGCCGTAGT
mUbc9as	GGCGATCCCCGACATATTCA

Les gènes de ménage *Gapdh*, *Hprt* et *Actb* ont été utilisés comme référence pour le calcul des  $\Delta Ct$ .

### Souris

Les souris *Ubc9<sup>+/-</sup>* ont été décrites dans (Nacerddine et al., 2005). Les souris *Ubc9<sup>-/-</sup>* *Rosa26 CreERT2* ont été décrites dans (Demarque et al., 2011). Les souris *Villin-CreERT2/Apc<sup>fl/+</sup>* ont été décrites dans (Andreu et al., 2005). L'AOM (A5486 Sigma) a été injecté dans le péritoine des souris à la dose de 100mg/g. Le DSS (40 000 g/mol, AppliChem) a été administré dans l'eau de boisson à la concentration de 2%, et préparé fraîchement à chaque cure. Les souris ont été élevées dans les animaleries de l'Institut Pasteur. Les expériences impliquant des animaux ont été menées conformément aux lois françaises et ont suivi les recommandations institutionnelles en vigueur. Elles ont été validées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de l'Institut Pasteur (C2EA 89).

### Test Hemocult®

La présence de sang dans les selles a été évaluée par le test de guaiac, à l'aide de kits Hemocult®, et qui repose sur l'oxydation de l'acide alpha-guaiaconique en quinone de couleur bleue.

### Immunohistochimie et analyse histologique des échantillons humains

Les analyses d'immunohistochimie ont été réalisées par le service d'anatomopathologie de l'hôpital Cochin sous la direction du Pr Benoît Terris.

### Histologie murine

Les tissus prélevés ont été immergés dans une solution de formaline 10% à pH 7 pendant une nuit, puis rincés à l'eau et conservés dans l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à inclusion

en paraffine, puis coupés en sections de 4  $\mu\text{m}$ . Les sections ont été colorés à l'aide d'une solution d'hématoxyline-éosine puis analysée par le Dr Grégory Jouvion de l'équipe de Fabrice Chrétien, « Histopathologie humaine et modèles animaux » à l'Institut Pasteur.

### **Clustering non-supervisé**

Le clustering non-supervisé a été réalisé à l'aide du logiciel dChIP (Li and Wong, 2001).

## Bibliographie

Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Egaña, I., Hjerpe, R., Fraser, P., Hay, R.T., Rodriguez, M.S., and Lang, V. (2012). Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and NF- $\kappa$ B activity. *PLoS One* 7, e51672.

al-Khodairy, F., Enoch, T., Hagan, I.M., and Carr, A.M. (1995). The *Schizosaccharomyces pombe* *hus5* gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis. *J. Cell Sci.* 108 ( Pt 2, 475–486.

Alkuraya, F.S., Saadi, I., Lund, J.J., Turbe-Doan, A., Morton, C.C., and Maas, R.L. (2006). SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science* 313, 1751.

Andersen, N.N., and Jess, T. (2013). Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased? *World J. Gastroenterol.* 19, 7561–7568.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., et al. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following *Apc* loss in the mouse intestine. *Development* 132, 1443–1451.

Apionishev, S., Malhotra, D., Raghavachari, S., Tanda, S., and Rasooly, R.S. (2001). The *Drosophila* UBC9 homologue *lesswright* mediates the disjunction of homologues in meiosis I. *Genes Cells* 6, 215–224.

Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Modlin, R.L., and Shuai, K. (2003). PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J. Biol. Chem.* 278, 21327–21330.

Arthur, J.S.C., and Ley, S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 679–692.

Atreya, I., and Neurath, M.F. (2008). Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8, 561–572.

Baba, D., Maita, N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435, 979–982.

Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Park, J.A., Kim, S.-H., Bae, M.-K., Choi, S.-J., and Kim, K.-W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 $\alpha$  stability and its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 394–400.

Bassi, C., Ho, J., Srikumar, T., Dowling, R.J.O., Gorrini, C., Miller, S.J., Mak, T.W., Neel, B.G., Raught, B., and Stambolic, V. (2013). Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science* 341, 395–399.

Bawa-Khalife, T., Cheng, J., Lin, S.-H., Ittmann, M.M., and Yeh, E.T.H. (2010). SENP1 induces prostatic intraepithelial neoplasia through multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 285, 25859–25866.

Becker, J., Barysch, S. V., Karaca, S., Dittner, C., Hsiao, H.-H., Berriel Diaz, M., Herzig, S., Urlaub, H., and Melchior, F. (2013). Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 525–531.

Bentz, G.L., Shackelford, J., and Pagano, J.S. (2012). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 regulates the function of interferon regulatory factor 7 by inducing its sumoylation. *J. Virol.* 86, 12251–12261.

Bergink, S., and Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458, 461–467.

Bernardi, R., and Pandolfi, P.P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 1006–1016.

Berta, M. a, Mazure, N., Hattab, M., Pouysségur, J., and Brahimi-Horn, M.C. (2007). SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  reduces its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 646–652.

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d’Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., et al. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 480, 94–98.

Biggins, S., Bhalla, N., Chang, A., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2001). Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 453–470.

Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R., and Dejean, A. (2006). The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol. Cell* 22, 783–794.

Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., and Freemont, P.S. (1996). PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971–982.

Boggio, R., Colombo, R., Hay, R.T., Draetta, G.F., and Chiocca, S. (2004). A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol. Cell* 16, 549–561.

Bonilla, W. V., Pinschewer, D.D., Klenerman, P., Rousson, V., Gaboli, M., Pandolfi, P.P., Zinkernagel, R.M., Salvato, M.S., and Hengartner, H. (2002). Effects of promyelocytic leukemia protein on virus-host balance. *J. Virol.* 76, 3810–3818.

Bonne-Andrea, C., Kahli, M., Mechali, F., Lemaitre, J.-M., Bossis, G., and Coux, O. (2013). SUMO2/3 modification of cyclin E contributes to the control of replication origin firing. *Nat. Commun.* 4, 1850.

Bossis, G., and Melchior, F. (2006). Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol. Cell* 21, 349–357.

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.

Broday, L., Kolotuev, I., Didier, C., Bhoumik, A., Gupta, B.P., Sternberg, P.W., Podbilewicz, B., and Ronai, Z. (2004). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is required for gonadal and uterine-vulval morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 18, 2380–2391.

Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., Atwater, S., and Bishop, J.M. (1997). A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2551–2556.

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.

Castorálová, M., Březinová, D., Svěda, M., Lipov, J., Ruml, T., and Knejzlík, Z. (2012). SUMO-2/3 conjugates accumulating under heat shock or MG132 treatment result largely from new protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 911–919.

Chang, C.-C., Naik, M.T., Huang, Y.-S., Jeng, J.-C., Liao, P.-H., Kuo, H.-Y., Ho, C.-C., Hsieh, Y.-L., Lin, C.-H., Huang, N.-J., et al. (2011a). Structural and functional roles of Daxx

SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation. *Mol. Cell* 42, 62–74.

Chang, C.-W., Chang, G.-D., and Chen, H. (2011b). A Novel Cyclic AMP/Epac1/CaMKI Signaling Cascade Promotes GCM1 Desumoylation and Placental Cell Fusion. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3820–3831.

Chang, T., Xu, S., Taylor, P., Kanno, T., and Ozato, K. (2012). The small ubiquitin-like modifier-deconjugating enzyme sentrin-specific peptidase 1 switches IFN regulatory factor 8 from a repressor to an activator during macrophage activation. *J. Immunol.* 189, 3548–3556.

Chang, T.-H., Kubota, T., Matsuoka, M., Jones, S., Bradfute, S.B., Bray, M., and Ozato, K. (2009). Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. *PLoS Pathog.* 5, e1000493.

Cheema, A., Knights, C.D., Rao, M., Catania, J., Perez, R., Simons, B., Dakshanamurthy, S., Kolukula, V.K., Tilli, M., Furth, P.A., et al. (2010). Functional mimicry of the acetylated C-terminal tail of p53 by a SUMO-1 acetylated domain, SAD. *J. Cell. Physiol.* 225, 371–384.

Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L., and de Thé, H. (1995). Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* 9, 2027–2033.

Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H., and de Thé, H. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J. Virol.* 72, 1043–1051.

Chen, S., Yang, T., Liu, F., Li, H., Guo, Y., Yang, H., Xu, J., Song, J., Zhu, Z., and Liu, D. (2014). Inflammatory factor-specific sumoylation regulates NF- $\kappa$ B signalling in glomerular cells from diabetic rats. *Inflamm. Res.* 63, 23–31.

Chen, Y., Wen, D., Huang, Z., Huang, M., Luo, Y., Liu, B., Lu, H., Wu, Y., Peng, Y., and Zhang, J. (2012). 2-(4-Chlorophenyl)-2-oxoethyl 4-benzamidobenzoate derivatives, a novel class of SENP1 inhibitors: Virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6867–6870.

Cheng, J., Wang, D., Wang, Z., and Yeh, E.T.H. (2004). SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6021–6028.



Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L., and Yeh, E.T.H. (2006). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8, 667–676.

Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., and Yeh, E.T.H. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131, 584–595.

Chiu, H., Ring, B.C., Sorrentino, R.P., Kalamarz, M., Garza, D., and Govind, S. (2005). dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 288, 60–72.

Chu, Y., and Yang, X. (2011). SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene* 30, 1108–1116.

Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803–1805.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30, 1073–1081.

Cremona, C. a, Sarangi, P., Yang, Y., Hang, L.E., Rahman, S., and Zhao, X. (2012). Extensive DNA damage-induced sumoylation contributes to replication and repair and acts in addition to the *mec1* checkpoint. *Mol. Cell* 45, 422–432.

Crohn, B.B., and Rosenberg, H. (1925). THE SIGMOIDOSCOPIC PICTURE OF CHRONIC ULCERATIVE COLITIS (NON-SPECIFIC). *Am. J. Med. Sci.* 170, 220–227.

Culver, C., Sundqvist, A., Mudie, S., Melvin, A., Xirodimas, D., and Rocha, S. (2010). Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4901–4921.

Dawlaty, M.M., Malureanu, L., Jeganathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., and van Deursen, J.M. (2008). Resolution of Sister Centromeres Requires RanBP2-Mediated SUMOylation of Topoisomerase II $\alpha$ . *Cell* 133, 103–115.

Dehennaut, V., Loison, I., Dubuissez, M., Nassour, J., Abbadie, C., and Leprince, D. (2013). DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *J. Biol. Chem.* 288, 10254–10264.

Delker, D.A., McKnight, S.J., and Rosenberg, D.W. (1998). The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of the colon carcinogen methylazoxymethanol. *Toxicol. Sci.* 45, 66–71.

Demarque, M.D., Nacerddine, K., Neyret-Kahn, H., Andrieux, A., Danenberg, E., Jouvion, G., Bomme, P., Hamard, G., Romagnolo, B., Terris, B., et al. (2011). Sumoylation by Ubc9 regulates the stem cell compartment and structure and function of the intestinal epithelium in mice. *Gastroenterology* *140*, 286–296.

DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 309–316.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D., and Hay, R.T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 10618–10624.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 Modification of I $\kappa$ B $\alpha$  Inhibits NF- $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell* *2*, 233–239.

Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 859–868.

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., Boutell, C., and Hale, B.G. (2013). Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 400–411.

Flotho, A., and Melchior, F. (2013). Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 357–385.

Flotho, A., and Werner, A. (2012). The RanBP2/RanGAP1\*SUMO1/Ubc9 complex: A multisubunit E3 ligase at the intersection of sumoylation and the RanGTPase cycle. *Nucleus* *3*.

Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 104–120.

Fu, J., Xiong, Y., Xu, Y., Cheng, G., and Tang, H. (2011). MDA5 is SUMOylated by PIAS2 $\beta$  in the upregulation of type I interferon signaling. *Mol. Immunol.* *48*, 415–422.

Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Nishimura, S., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., and Yoshida, M. (2009a). Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem. Biol.* *16*, 133–140.

Fukuda, I., Ito, A., Uramoto, M., Saitoh, H., Kawasaki, H., Osada, H., and Yoshida, M. (2009b). Kerriamycin B inhibits protein SUMOylation. *J. Antibiot. (Tokyo)*. *62*, 221–224.

Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* *46*, 845–852.

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.

Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 861–871.

Geddes, K., Magalhães, J.G., and Girardin, S.E. (2009). Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 465–479.

Geletu, M., Balkhi, M.Y., Peer Zada, A.A., Christopeit, M., Pulikkan, J.A., Trivedi, A.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2007). Target proteins of C/EBPalphap30 in AML: C/EBPalphap30 enhances sumoylation of C/EBPalphap42 via up-regulation of Ubc9. *Blood* *110*, 3301–3309.

Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* *25*, 57–70.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.

Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 11–15.

Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M.H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G.J., Mann, M., and Hay, R.T. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci. Signal.* *2*, ra24.

Gong, L., Millas, S., Maul, G.G., and Yeh, E.T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J. Biol. Chem.* 275, 3355–3359.

González-Santamaría, J., Campagna, M., Ortega-Molina, a, Marcos-Villar, L., de la Cruz-Herrera, C.F., González, D., Gallego, P., Lopitz-Otsoa, F., Esteban, M., Rodríguez, M.S., et al. (2012). Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO. *Cell Death Dis.* 3, e393.

Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J. Biol. Chem.* 276, 18513–18518.

Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 *Suppl* 1, S9–17.

Goubau, D., Deddouche, S., and Reis E Sousa, C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 38, 855–869.

Grégoire, S., and Yang, X. (2005). Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2273–2287.

Grisolano, J.L., Wesselschmidt, R.L., Pelicci, P.G., and Ley, T.J. (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89, 376–387.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589–600.

Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A., et al. (2004). A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 36, 837–841.

Guo, Z., Kanjanapangka, J., Liu, N., Liu, S., Liu, C., Wu, Z., Wang, Y., Loh, T., Kowolik, C., Jansen, J., et al. (2012). Sequential posttranslational modifications program FEN1 degradation during cell-cycle progression. *Mol. Cell* 47, 444–456.

Hamada, M., Haeger, A., Jeganathan, K.B., van Ree, J.H., Malureanu, L., Wälde, S., Joseph, J., Kehlenbach, R.H., and van Deursen, J.M. (2011). Ran-dependent docking of importin- $\beta$  to RanBP2/Nup358 filaments is essential for protein import and cell viability. *J. Cell Biol.* *194*, 597–612.

Han, K.-J., Jiang, L., and Shu, H.-B. (2008). Regulation of IRF2 transcriptional activity by its sumoylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *372*, 772–778.

Hari, K.L., Cook, K.R., and Karpen, G.H. (2001). The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* *15*, 1334–1348.

Hasegawa, M., Fujimoto, Y., Lucas, P.C., Nakano, H., Fukase, K., Núñez, G., and Inohara, N. (2008). A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF- $\kappa$ B activation. *EMBO J.* *27*, 373–383.

Hay, R.T. (2004). Modifying NEMO. *Nat. Cell Biol.* *6*, 89–91.

Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* *18*, 1–12.

Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T. (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* *280*, 212–221.

Hershko, a, and Ciechanover, a (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.

Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1979). Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 3107–3110.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 1783–1786.

Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A. (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J. Biol. Chem.* *256*, 1525–1528.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 195–201.

Hicke, L., Schubert, H.L., and Hill, C.P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 610–621.

Hickey, C.M., Wilson, N.R., and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 755–766.

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.

Hirohama, M., Kumar, A., Fukuda, I., Matsuoka, S., Igarashi, Y., Saitoh, H., Takagi, M., Shin-ya, K., Honda, K., Kondoh, Y., et al. (2013). Spectomycin B1 as a novel SUMOylation inhibitor that directly binds to SUMO E2. *ACS Chem. Biol.* *8*, 2635–2642.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* *30*, 405–439.

Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* *458*, 422–429.

Holway, A.H., Kim, S.-H., La Volpe, A., and Michael, W.M. (2006). Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J. Cell Biol.* *172*, 999–1008.

Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 644–658.

Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* *276*, 40263–40267.

Hu, X. V, Rodrigues, T.M. a, Tao, H., Baker, R.K., Miraglia, L., Orth, A.P., Lyons, G.E., Schultz, P.G., and Wu, X. (2010). Identification of RING finger protein 4 (RNF4) as a modulator of DNA demethylation through a functional genomics screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15087–15092.

Huang, J., Yan, J., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., Shi, T., Zhu, C., Chen, C., Liu, X., Cheng, J., et al. (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat. Commun.* *3*, 911.

Huang, L., Ohsako, S., and Tanda, S. (2005). The lesswright mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *280*, 407–420.

Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.-H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKK $\gamma$  by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Cell* *115*, 565–576.

Hutten, S., Chachami, G., Winter, U., Melchior, F., and Lamond, A.I. (2014). A role for the CB-associated SUMO isopeptidase USPL1 in RNAPII-mediated snRNA transcription. *J. Cell Sci.* 1065–1078.

Ikushima, H., Negishi, H., and Taniguchi, T. (2013). The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*

Jacques, C., Baris, O., Prunier-Mirebeau, D., Savagner, F., Rodien, P., Rohmer, V., Franc, B., Guyetant, S., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2005). Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncocytic tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 2314–2320.

Jensen, O.N. (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *8*, 33–41.

Johnson, E.S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J. Cell Biol.* *147*, 981–994.

Johnson, E.S., and Gupta, a a (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* *106*, 735–744.

Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J., and Blobel, G. (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* *16*, 5509–5519.

Jones, D., Crowe, E., Stevens, T.A., and Candido, E.P.M. (2002). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* *3*, RESEARCH0002.

Joslyn, G., Carlson, M., Thliveris, A., Albertsen, H., Gelbert, L., Samowitz, W., Groden, J., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., et al. (1991). Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66, 601–613.

Kang, X., Li, J., Zou, Y., Yi, J., Zhang, H., Cao, M., Yeh, E.T.H., and Cheng, J. (2010). PIASy stimulates HIF1 $\alpha$  SUMOylation and negatively regulates HIF1 $\alpha$  activity in response to hypoxia. *Oncogene* 29, 5568–5578.

Kessler, J.D., Kahle, K.T., Sun, T., Meerbrey, K.L., Schlabach, M.R., Schmitt, E.M., Skinner, S.O., Xu, Q., Li, M.Z., Hartman, Z.C., et al. (2012). A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science* 335, 348–353.

Kim, J., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Pfarr, C.M., and Williams, S.C. (2002). Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J. Biol. Chem.* 277, 38037–38044.

Kim, Y.S., Nagy, K., Keyser, S., and Schneekloth, J.S. (2013). An electrophoretic mobility shift assay identifies a mechanistically unique inhibitor of protein sumoylation. *Chem. Biol.* 20, 604–613.

Kim, Y.S., Keyser, S.G.L., and Schneekloth, J.S. (2014). Synthesis of 2',3',4'-trihydroxyflavone (2-D08), an inhibitor of protein sumoylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 1094–1097.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87, 159–170.

Kinzler, K., Nilbert, M., Su, L., Vogelstein, B., Bryan, T., Levy, D., Smith, K., Preisinger, A., Hedge, P., McKechnie, D., et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* (80-. ). 253, 661–665.

Kirsh, O., Seeler, J., Pichler, A., Gast, A., Müller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., et al. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J.* 21, 2682–2691.

Klein, U.R., Haindl, M., Nigg, E.A., and Muller, S. (2009). RanBP2 and SENP3 function in a mitotic SUMO2/3 conjugation-deconjugation cycle on Borealin. *Mol. Biol. Cell* 20, 410–418.



Kojima, M., Morisaki, T., Sasaki, N., Nakano, K., Mibu, R., Tanaka, M., and Katano, M. (2004). Increased nuclear factor- $\kappa$ B activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res.* *24*, 675–681.

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

Kovalenko, O. V, Plug, a W., Haaf, T., Gonda, D.K., Ashley, T., Ward, D.C., Radding, C.M., and Golub, E.I. (1996). Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 interacts with Rad51 recombination protein and localizes in synaptonemal complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2958–2963.

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Taylor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., and Ozato, K. (2008). Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression. *J. Biol. Chem.* *283*, 25660–25670.

Kubota, Y., O’Grady, P., Saito, H., and Takekawa, M. (2011). Oncogenic Ras abrogates MEK SUMOylation that suppresses the ERK pathway and cell transformation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 282–291.

Kumar, A., Ito, A., Hirohama, M., Yoshida, M., and Zhang, K.Y.J. (2013). Identification of quinazolinyloxy biaryl urea as a new class of SUMO activating enzyme 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *23*, 5145–5149.

Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.-Y., and Vierstra, R.D. (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* *278*, 6862–6872.

Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de Thé, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RAR $\alpha$  through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* *10*, 547–555.

Lee, B., and Muller, M.T. (2009). SUMOylation enhances DNA methyltransferase 1 activity. *Biochem. J.* *421*, 449–461.

Lee, J.-S., and Thorgeirsson, S.S. (2004). Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: Classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets. *Gastroenterology* *127*, S51–S55.

Lee, G.W., Melchior, F., Matunis, M.J., Mahajan, R., Tian, Q., and Anderson, P. (1998). Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires Ubc9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. *J. Biol. Chem.* 273, 6503–6507.

Lee, J.S., Choi, H.J., Baek, S.H., Wotton, D., and Merrill, J.C. (2009). *SUMO Regulation of Cellular Processes* (Dordrecht: Springer Netherlands).

Lee, M.T., Bakir, A.A., Nguyen, K.N., and Bachant, J. (2011). The SUMO isopeptidase Ulp2p is required to prevent recombination-induced chromosome segregation lethality following DNA replication stress. *PLoS Genet.* 7.

Lenschow, D.J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V, Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R.E., García-Sastre, A., et al. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1371–1376.

Li, C., and Wong, W.H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 31–36.

Li, S.J., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246–251.

Li, J., Xu, Y., Long, X.-D., Wang, W., Jiao, H.-K., Mei, Z., Yin, Q.-Q., Ma, L.-N., Zhou, A.-W., Wang, L.-S., et al. (2014). Cbx4 governs HIF-1 $\alpha$  to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity. *Cancer Cell* 25, 118–131.

Li, R., Wang, L., Liao, G., Guzzo, C.M., Matunis, M.J., Zhu, H., and Hayward, S.D. (2012). SUMO binding by the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is crucial for BGLF4 function. *J. Virol.* 86, 5412–5421.

Liang, Q., Deng, H., Li, X., Wu, X., Tang, Q., Chang, T.-H., Peng, H., Rauscher, F.J., Ozato, K., and Zhu, F. (2011). Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.* 187, 4754–4763.

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.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D., Shuai, K., and Biology, C. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 10626–10631.

Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J., and Shuai, K. (2001). A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3203–3207.

Liu, B., Mink, S., Wong, K. a, Stein, N., Getman, C., Dempsey, P.W., Wu, H., and Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 891–898.

Liu, B., Yang, R., Wong, K. a, Getman, C., Stein, N., Teitell, M.A., Cheng, G., Wu, H., and Shuai, K. (2005). Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 1113–1123.

Liu, H., Zhang, J., Heine, G.F., Arora, M., Gulcin Ozer, H., Onti-Srinivasan, R., Huang, K., and Parvin, J.D. (2012a). Chromatin modification by SUMO-1 stimulates the promoters of translation machinery genes. *Nucleic Acids Res.* *40*, 10172–10186.

Liu, Q., Li, J., Khoury, J., Colgan, S.P., and Ibla, J.C. (2009). Adenosine signaling mediates SUMO-1 modification of IkappaBalpha during hypoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* *284*, 13686–13695.

Liu, X., Chen, W., Wang, Q., Li, L., and Wang, C. (2013). Negative regulation of TLR inflammatory signaling by the SUMO-deconjugating enzyme SENP6. *PLoS Pathog.* *9*, e1003480.

Liu, Y., Bridges, R., Wortham, A., and Kulesz-Martin, M. (2012b). NF-κB repression by PIAS3 mediated RelA SUMOylation. *PLoS One* *7*, e37636.

Lu, X., Olsen, S.K., Capili, A.D., Cisar, J.S., Lima, C.D., Tan, D.S., and Ubl, U. (2010). Designed Semisynthetic Protein Inhibitors of Ub / Ubl E1 Activating Enzymes lysine side chains on target proteins via an isopeptide bond . *Initial.* *5*, 1748–1749.

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.

Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I. a, van Santen, M. a, van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2010). Site-specific identification of SUMO-2

targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol. Cell* 39, 641–652.

Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135, 1457–1470.

McCartney, B.M., and Näthke, I.S. (2008). Cell regulation by the Apc protein Apc as master regulator of epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 186–193.

McDoniels-Silvers, A.L., Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A., and You, M. (2002). Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 8, 1127–1138.

El Mchichi, B., Regad, T., Maroui, M.-A., Rodriguez, M.S., Aminev, A., Gerbaud, S., Escriou, N., Dianoux, L., and Chelbi-Alix, M.K. (2010). SUMOylation promotes PML degradation during encephalomyocarditis virus infection. *J. Virol.* 84, 11634–11645.

McNally, B.A., Trgovcich, J., Maul, G.G., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection. *PLoS One* 3.

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.

Meira, L.B., Bugni, J.M., Green, S.L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B.H., Rogers, A.B., Moroski-Erkul, C.A., McFaline, J.L., et al. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2516–2525.

Meluh, P.B., and Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol. Biol. Cell* 6, 793–807.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.

Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H.H., Urlaub, H., and Melchior, F. (2008). Mechanism and Consequences for Paralog-Specific Sumoylation of Ubiquitin-Specific Protease 25. *Mol. Cell* 30, 610–619.

Mi, Z., Fu, J., Xiong, Y., and Tang, H. (2010). SUMOylation of RIG-I positively regulates the type I interferon signaling. *Protein Cell* 1, 275–283.

Mo, Y.-Y., Yu, Y., Theodosiou, E., Ee, P.L.R., and Beck, W.T. (2005). A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* 24, 2677–2683.

Moschos, S.J., Smith, a P., Mandic, M., Athanassiou, C., Watson-Hurst, K., Jukic, D.M., Edington, H.D., Kirkwood, J.M., and Becker, D. (2007). SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas. *Oncogene* 26, 4216–4225.

Moschos, S.J., Jukic, D.M., Athanassiou, C., Bhargava, R., Dacic, S., Wang, X., Kuan, S.-F., Fayewicz, S.L., Galambos, C., Acquafondata, M., et al. (2010). Expression analysis of Ubc9, the single small ubiquitin-like modifier (SUMO) E2 conjugating enzyme, in normal and malignant tissues. *Hum. Pathol.* 41, 1286–1298.

Mowen, K. a, and David, M. (2014). Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. *Nat. Immunol.* 15, 512–520.

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.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev. Cell* 9, 769–779.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* 20, 966–976.

Nelson, W.G., De Marzo, A.M., and Isaacs, W.B. (2003). Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 349, 366–381.

Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* 2, 1998–2004.

Neyret-Kahn, H., Benhamed, M., Ye, T., Le Gras, S., Cossec, J.-C., Lapaquette, P., Bischof, O., Ouspenskaia, M., Dasso, M., Seeler, J., et al. (2013). Sumoylation at chromatin

governs coordinated repression of a transcriptional program essential for cell growth and proliferation. *Genome Res.* 23, 1563–1579.

Ning, S., Pagano, J.S., and Barber, G.N. (2011). IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* 12, 399–414.

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., and Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665–669.

O’Neill, L. a J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.

Okura, T., Gong, L., Kamitani, T., Wada, T., Okura, I., Wei, C.F., Chang, H.M., and Yeh, E.T. (1996). Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J. Immunol.* 157, 4277–4281.

Orth, K. (2000). Disruption of Signaling by Yersinia Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. *Science* (80-. ). 290, 1594–1597.

Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y., and Gill, G. (2009). Direct Binding of CoREST1 to SUMO-2/3 Contributes to Gene-Specific Repression by the LSD1/CoREST1/HDAC Complex. *Mol. Cell* 34, 145–154.

Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T.H., 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.

Paddibhatla, I., Lee, M.J., Kalamarz, M.E., Ferrarese, R., and Govind, S. (2010). Role for sumoylation in systemic inflammation and immune homeostasis in *Drosophila* larvae. *PLoS Pathog.* 6, e1001234.

Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.-C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.-H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102.

Pampin, M., Simonin, Y., Blondel, B., Percherancier, Y., and Chelbi-Alix, M.K. (2006). Cross talk between PML and p53 during poliovirus infection: implications for antiviral defense. *J. Virol.* 80, 8582–8592.

Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759–763.

Pfander, B., Moldovan, G.-L., Sacher, M., Hoege, C., and Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428–433.

Picard, N., Caron, V., Bilodeau, S., Sanchez, M., Mascle, X., Aubry, M., and Tremblay, A. (2012). Identification of Estrogen Receptor as a SUMO-1 Target Reveals a Novel Phosphorylated Sumoylation Motif and Regulation by Glycogen Synthase Kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2709–2721.

Pinto, M.P., Carvalho, A.F., Grou, C.P., Rodríguez-Borges, J.E., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J.E. (2012). Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1958–1966.

Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14145–14150.

Psakhye, I., and Jentsch, S. (2012). Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* 151, 807–820.

Pungalija, P., Kulkarni, D., Park, H.-J., Marshall, H., Zheng, H., Lackland, H., Saleem, A., and Rubin, E.H. (2007). TOPORS functions as a SUMO-1 E3 ligase for chromatin-modifying proteins. *J. Proteome Res.* 6, 3918–3923.

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.

Qiao, Z., Wang, W., Wang, L., Wen, D., Zhao, Y., Wang, Q., Meng, Q., Chen, G., Wu, Y., and Zhou, H. (2011). Design, synthesis, and biological evaluation of benzodiazepine-based SUMO-specific protease 1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 6389–6392.

Rajsbaum, R., García-Sastre, A., and Versteeg, G. a (2014). TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J. Mol. Biol.* 426, 1265–1284.

Ran, Y., Liu, T.-T., Zhou, Q., Li, S., Mao, A., Li, Y., Liu, L., Cheng, J., and Shu, H. (2011). SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 283–292.

Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P.P., de Thé, H., and Chelbi-Alix, M.K. (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J.* 20, 3495–3505.

Ribet, D., and Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Lett.* 584, 2748–2758.

Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M.-A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Dejean, A., and Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature* 464, 1192–1195.

Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* 276, 12654–12659.

Rosonina, E., Duncan, S.M., and Manley, J.L. (2010). SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev.* 24, 1242–1252.

Rosonina, E., Duncan, S.M., and Manley, J.L. (2012). Sumoylation of transcription factor Gcn4 facilitates its Srb10-mediated clearance from promoters in yeast. *Genes Dev.* 26, 350–355.

Rytinki, M.M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jääskeläinen, T., and Palvimo, J.J. (2009). PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3029–3041.

Ryu, K.-Y., Maehr, R., Gilchrist, C. a, Long, M. a, Bouley, D.M., Mueller, B., Ploegh, H.L., and Kopito, R.R. (2007). The mouse polyubiquitin gene UbC is essential for fetal liver development, cell-cycle progression and stress tolerance. *EMBO J.* 26, 2693–2706.

Ryu, K.-Y., Sinnar, S. a, Reinholdt, L.G., Vaccari, S., Hall, S., Garcia, M. a, Zaitseva, T.S., Bouley, D.M., Boekelheide, K., Handel, M.A., et al. (2008). The mouse polyubiquitin gene Ubb is essential for meiotic progression. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1136–1146.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15, 3088–3103.



Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* *275*, 6252–6258.

Sampson, D.A., Wang, M., and Matunis, M.J. (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* *276*, 21664–21669.

Santti, H., Mikkonen, L., Anand, A., Hirvonen-Santti, S., Toppari, J., Panhuysen, M., Vauti, F., Perera, M., Corte, G., Wurst, W., et al. (2005). Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight. *J. Mol. Endocrinol.* *34*, 645–654.

Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., and Murphy, K.M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* *13*, 1145–1154.

Schulz, S., Chachami, G., Kozackiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ovaa, H., Wittbrodt, J., et al. (2012). Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.* *13*, 930–938.

Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 690–699.

Segura, E., and Amigorena, S. (2013). Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* *34*, 440–445.

Seufert, W., Futcher, B., and Jentsch, S. (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* *373*, 78–81.

Shayeghi, M., Doe, C.L., Tavassoli, M., and Watts, F.Z. (1997). Characterisation of *Schizosaccharomyces pombe* rad31, a UBA-related gene required for DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res* *25*, 1162–1169.

Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K., and Chen, D.J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* *36*, 271–279.

Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13225–13230.

Shin, E.J., Shin, H.M., Nam, E., Kim, W.S., Kim, J.-H., Oh, B.-H., and Yun, Y. (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* *13*, 339–346.

Shuai, K., and Liu, B. (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 593–605.

Sipos, F., and Muzes, G. (2011). Isolated lymphoid follicles in colon: switch points between inflammation and colorectal cancer? *World J. Gastroenterol.* *17*, 1666–1673.

Sommer, S., Weikart, N.D., Linne, U., and Mootz, H.D. (2013). Covalent inhibition of SUMO and ubiquitin-specific cysteine proteases by an in situ thiol-alkyne addition. *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 2511–2517.

Soucy, T. a, Dick, L.R., Smith, P.G., Milhollen, M. a, and Brownell, J.E. (2010). The NEDD8 Conjugation Pathway and Its Relevance in Cancer Biology and Therapy. *Genes Cancer* *1*, 708–716.

Spirek, M., Estreicher, A., Cszasz, E., Wells, J., McFarlane, R.J., Watts, F.Z., and Loidl, J. (2010). SUMOylation is required for normal development of linear elements and wild-type meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* *119*, 59–72.

Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saïb, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M.C., and Schindler, C. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* *11*, 2565–2573.

Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, 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.

Steinacher, R., and Schär, P. (2005). Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr. Biol.* *15*, 616–623.

Stephan, A.K., Kliszczak, M., and Morrison, C.G. (2011). The Nse2/Mms21 SUMO ligase of the Smc5/6 complex in the maintenance of genome stability. *FEBS Lett.* *585*, 2907–2913.

Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Krüger, I., and Suske, G. (2008). SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep.* *9*, 899–906.

Stielow, B., Krüger, I., Diezko, R., Finkernagel, F., Gillemans, N., Kong-a-San, J., Philipsen, S., and Suske, G. (2010). Epigenetic silencing of spermatocyte-specific and

neuronal genes by SUMO modification of the transcription factor Sp3. *PLoS Genet.* 6, e1001203.

Stratton, M.R., Campbell, P.J., and Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.

Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K. a, Wu, H., and Shuai, K. (2007). Control of specificity and magnitude of NF-kappa B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11643–11648.

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S.-I., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., et al. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243–249.

Tallman, M.S., and Altman, J.K. (2009). How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* 114, 5126–5135.

Tammsalu, T., Matic, I., Jaffray, E.G., Ibrahim, a. F.M., Tatham, M.H., and Hay, R.T. (2014). Proteome-Wide Identification of SUMO2 Modification Sites. *Sci. Signal.* 7, rs2–rs2.

Tan, J.-A.T., Song, J., Chen, Y., and Durrin, L.K. (2010). Phosphorylation-dependent interaction of SATB1 and PIAS1 directs SUMO-regulated caspase cleavage of SATB1. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2823–2836.

Tang, Z., Hecker, C.M., Scheschonka, A., and Betz, H. (2008). Protein interactions in the sumoylation cascade: lessons from X-ray structures. *FEBS J.* 275, 3003–3015.

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.

Tatham, M.H., Kim, S., Yu, B., Jaffray, E., Song, J., Zheng, J., Rodriguez, M.S., Hay, R.T., and Chen, Y. (2003). Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry* 42, 9959–9969.

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.

Taylor, D.L., Ho, J.C.Y., Oliver, A., and Watts, F.Z. (2002). Cell-cycle-dependent localisation of Ulp1, a *Schizosaccharomyces pombe* Pmt3 (SUMO)-specific protease. *J. Cell Sci.* *115*, 1113–1122.

Tempé, D., Vives, E., Brockly, F., Brooks, H., De Rossi, S., Piechaczyk, M., and Bossis, G. (2014). SUMOylation of the inducible (c-Fos:c-Jun)/AP-1 transcription complex occurs on target promoters to limit transcriptional activation. *Oncogene* *33*, 921–927.

Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem.* *279*, 28257–28265.

The Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* *487*, 330–337.

De Thé, H., and Chen, Z. (2010). Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 775–783.

De Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., and Dejean, A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* *347*, 558–561.

De Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* *66*, 675–684.

Torres-Rosell, J., Sunjevaric, I., De Piccoli, G., Sacher, M., Eckert-Boulet, N., Reid, R., Jentsch, S., Rothstein, R., Aragón, 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.

Ueda, M., Ota, J., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Ohki, R., Wada, T., Koinuma, K., Kano, Y., Ozawa, K., and Mano, H. (2003). DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* *123*, 288–296.

Ullmann, R., Chien, C.D., Avantaggiati, M.L., and Muller, S. (2012). An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol. Cell* *46*, 759–770.

Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Grönholm, J., Palvimo, J.J., and Silvennoinen, O. (2005). SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood* *106*, 224–226.

Uno, M., Koma, Y., Ban, H.S., and Nakamura, H. (2012). Discovery of 1-[4-(N-benzylamino)phenyl]-3-phenylurea derivatives as non-peptidic selective SUMO-sentrin specific protease (SEN1) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 5169–5173.

Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2012). Ubiquitin-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 323–357.

Veltman, I.M., Vreede, L.A., Cheng, J., Looijenga, L.H.J., Janssen, B., Schoenmakers, E.F.P.M., Yeh, E.T.H., and van Kessel, A.G. (2005). Fusion of the SUMO/Sentrin-specific protease 1 gene SEN1 and the embryonic polarity-related mesoderm development gene MESDC2 in a patient with an infantile teratoma and a constitutional t(12;15)(q13;q25). *Hum. Mol. Genet.* 14, 1955–1963.

Vertegaal, A.C.O., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M., and Lamond, A.I. (2006). Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2298–2310.

Villalva, C., Tremat, P., Greenland, C., Thomas, C., Girard, J.P., Moebius, F., Delsol, G., and Brousset, P. (2002). Isolation of differentially expressed genes in NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 118, 791–798.

Vucic, D., Dixit, V.M., and Wertz, I.E. (2011). Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 439–452.

Wan, J., Subramonian, D., and Zhang, X.-D. (2012). SUMOylation in control of accurate chromosome segregation during mitosis. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 467–481.

Wang, L., and Banerjee, S. (2004). Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol. Rep.* 11, 1319–1324.

Wang, Z.Y., and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505–2515.

Wang, Q., Xia, N., Li, T., Xu, Y., Zou, Y., Zuo, Y., Fan, Q., Bawa-Khalife, T., Yeh, E.T.H., and Cheng, J. (2013). SUMO-specific protease 1 promotes prostate cancer progression and metastasis. *Oncogene* 32, 2493–2498.

Wang, W., Chen, Y., Wang, S., Hu, N., Cao, Z., Wang, W., Tong, T., and Zhang, X. (2014). PIAS $\alpha$  ligase enhances SUMO1 modification of PTEN protein as a SUMO E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 289, 3217–3230.

Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell* 29, 653–663.

Westbrook, A.M., Wei, B., Braun, J., and Schiestl, R.H. (2009). Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res.* 69, 4827–4834.

Wu, S.-Y., and Chiang, C.-M. (2009). Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *EMBO J.* 28, 1246–1259.

Xhemalce, B., Seeler, J.-S., Thon, G., Dejean, A., and Arcangioli, B. (2004). Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance. *EMBO J.* 23, 3844–3853.

Xu, P., and Yang, C. (2013). Emerging role of SUMOylation in plant development. *Plant Signal. Behav.* 8, e24727.

Xu, Y., Zuo, Y., Zhang, H., Kang, X., Yue, F., Yi, Z., Liu, M., Yeh, E.T.H., Chen, G., and Cheng, J. (2010). Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 36682–36688.

Yamaguchi, T., Sharma, P., Athanasiou, M., Kumar, A., Yamada, S., and Kuehn, M.R. (2005). Mutation of SENP1/SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5171–5182.

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, X.-J., and Grégoire, S. (2006). A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol. Cell* 23, 779–786.

Yang, E., Lerner, L., Besser, D., and Darnell, J.E. (2003). Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3. *J. Biol. Chem.* 278, 15794–15799.

Yang, P., Zhang, Y., Xu, J., Zhang, S., Yu, Q., Pang, J., Rao, X., Kuczma, M., Marrero, M.B., Fulton, D., et al. (2013). SUMO1 regulates endothelial function by modulating the overall signals in favor of angiogenesis and homeostatic responses. *Am. J. Transl. Res.* 5, 427–440.

Yokoyama, S., Woods, S.L., Boyle, G.M., Aoude, L.G., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A.E., Haq, R., Harland, M., et al. (2011). A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 480, 99–103.

Zeineldin, M., and Neufeld, K.L. (2013). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 80–89.

Zhang, F.-P., Mikkonen, L., Toppari, J., Palvimo, J.J., Thesleff, I., and Jänne, O.A. (2008). Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5381–5390.

Zhang, H., Kuai, X., Ji, Z., Li, Z., and Shi, R. (2013). Over-expression of small ubiquitin-related modifier-1 and sumoylated p53 in colon cancer. *Cell Biochem. Biophys.* 67, 1081–1087.

Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T.A., Evans, R.M., and Yao, T. (2005). Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8456–8464.

Zhong, S., Mu, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Plenary paper Role of SUMO-1 – modified PML in nuclear body formation. 95, 2748–2753.

Zhu, J., Zhu, S., Guzzo, C.M., Ellis, N.A., Sung, K.S., Choi, C.Y., and Matunis, M.J. (2008). Small ubiquitin-related modifier (SUMO) binding determines substrate recognition and paralog-selective SUMO modification. *J. Biol. Chem.* 283, 29405–29415.

Zhu, S., Goeres, J., Sixt, K.M., Békés, M., Zhang, X.D., Salvesen, G.S., and Matunis, M.J. (2009). Protection from Isopeptidase-Mediated Deconjugation Regulates Paralog-Selective Sumoylation of RanGAP1. *Mol. Cell* 33, 570–580.

Zinngrebe, J., Montinaro, A., Peltzer, N., and Walczak, H. (2014). Ubiquitin in the immune system. *EMBO Rep.* 15, 322.

## **Annexes**



## ANNEXE 1

**Table S1:** List of 224 genes differentially expressed in unstimulated Ubc9 KO vs WT BMDCs as determined by microarray analysis in 3 biological replicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni)

Probe Set ID	Fold Change F0 vs W0	Bonferroni p-value F0 vs W0	Gene Symbol	Gene Description
10462618	82,51005286	0	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
10462621	58,62710852	0	I830012O16Rik	RIKEN cDNA I830012O16 gene
10462623	57,45402258	0	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
10502791	48,17073393	0	Ifi44	interferon-induced protein 44
10462613	43,62139492	0	Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
10434778	34,3574486	0	Rtp4	receptor transporter protein 4
10569102	31,36381174	0	Irf7	interferon regulatory factor 7
10379633	25,18578861	0	Slfn1	schlafen 1
10360406	23,74468974	0	Ifi205	interferon activated gene 205
10531415	22,78922566	0	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
10524621	20,5856058	0	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
10399710	19,18006893	0	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
10502801	17,46761823	0	H28	histocompatibility 28
10458843	16,15025456	0	Sema6a	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
10374197	15,87217574	0	Ramp3	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3
10461622	15,70221305	0	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
10531994	15,43766873	0	Mpa2l	macrophage activation 2 like
10420483	15,21718925	0	Phf11	PHD finger protein 11
10531987	14,03035881	0	Gbp4	guanylate binding protein 4
10541307	13,99125043	0	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
10566366	13,83853196	0	Trim30d	tripartite motif-containing 30D
10437224	13,52004455	0	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
10451287	13,39504943	0	Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier
10406581	13,39419526	0	Dhfr	dihydrofolate reductase
10351873	13,19292907	0	Pyhin1	pyrin and HIN domain family, member 1
10533213	12,91044658	0	Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
10395039	12,23342951	0	Cmpk2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
10531980	12,0893938	0	Gbp9	guanylate-binding protein 9
10420488	11,87461637	0	D14Ert668e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed
10507143	11,81207077	0	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a

10507152	11,6144747	0	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B
10385533	11,47506961	0	Tgtp1	T-cell specific GTPase 1
10360373	11,0792322	0	E030037K03Rik	RIKEN cDNA E030037K03 gene
10571984	11,07593049	0	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
10398039	10,364395	0	Serpina3f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F
10461594	10,24554625	0	Ms4a4c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C
10461614	9,999659706	0	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
10383206	9,841464379	0	Rnf213	ring finger protein 213
10376324	9,803323967	0	Gm12250	predicted gene 12250
10524310	9,603052068	0	Ttc28	tetratricopeptide repeat domain 28
10533198	9,51673039	0	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
10379636	9,082566351	0	Slfn4	schlafen 4
10389143	8,842773892	0	Slfn8	schlafen 8
10378068	8,734535602	0	Xaf1	XIAP associated factor 1
10360382	8,608548481	0	Ifi204	interferon activated gene 204
10524631	8,59162485	0	Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
10410931	8,290516589	0	Vcan	versican
10416837	8,268696976	0	Irg1	immunoresponsive gene 1
10490150	7,841132289	0	Zbp1	Z-DNA binding protein 1
10444824	7,598817873	0	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6
10376326	7,018511046	0	Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2
10455954	6,962493135	0	Gm4951	predicted gene 4951
10569017	6,730870034	0	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
10574780	6,693097358	0	Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
10391207	6,664339974	0	Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
10496592	6,536036318	0	Gbp2	guanylate binding protein 2
10379615	6,456404645	0	Slfn5	schlafen 5
10512067	6,349279994	0	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
10496580	6,320067645	0	Gbp3	guanylate binding protein 3
10500335	6,263417293	0	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
10533246	6,175453131	0	Oasl1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G
10569494	6,092300061	0	Tnfrsf22	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22
10441233	5,773211184	3,68E-10	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
10429564	5,765237335	0	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
10379530	5,653937753	4,92E-08	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12
10351880	5,606447876	1,88E-09	E430029J22Rik	RIKEN cDNA E430029J22 gene
10581266	5,598312419	0	Tppp3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3
10385500	5,463365717	0	Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1
10496539	5,409682788	0	Gbp5	guanylate binding protein 5
10453747	5,338557602	0	Colec12	collectin sub-family member 12
10533256	5,166624373	0	Oasl1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A

10349157	5,108639029	0	Serpib2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2
10530692	5,092037345	1,65E-08	Kdr	kinase insert domain protein receptor
10360370	4,949565901	8,61E-07	BC094916	cDNA sequence BC094916
10379518	4,799955398	0	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
10473356	4,786735203	0	Ube216	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
10375515	4,568640743	1,81E-10	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47
10450675	4,554949313	2,97E-12	H2-T24	histocompatibility 2, T region locus 24
10579532	4,54486991	0	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2
10453759	4,487568621	4,18E-06	Gm10554	predicted gene 10554
10483110	4,343150662	1,19E-11	Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1
10409579	4,340032963	2,97E-11	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
10349166	4,297492137	1,09E-05	Serpib10-ps	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10, pseudogene
10439249	4,228119053	2,97E-11	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
10496555	4,226999671	2,97E-11	Gbp1	guanylate binding protein 1
10411019	4,162031835	1,35E-09	Msh3	mutS homolog 3 (E, coli)
10569504	4,105263996	0	Tnfrsf23	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23
10445746	4,06940819	1,36E-07	Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
10360391	4,023151314	1,48E-11	Ifi203	interferon activated gene 203
10538590	4,007118016	6,35E-10	Herc6	hect domain and RLD 6
10469255	4,005579564	0,0001734	Prkcq	protein kinase C, theta
10508614	3,937270957	9,95E-08	Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
10474936	3,877608097	3,56E-11	Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1
10554240	3,846760473	1,30E-06	Isg20	interferon-stimulated protein
10483828	3,812166152	2,03E-05	Pde11a	phosphodiesterase 11A
10367224	3,804379059	1,29E-09	Stat2	signal transducer and activator of transcription 2
10525158	3,803424587	0,001287688	Oas1b	2'-5' oligoadenylate synthetase 1B
10389134	3,770429829	1,98E-08	Slfn9	schlafen 9
10490632	3,769630194	9,53E-09	BC006779	cDNA sequence BC006779
10574727	3,768321354	4,70E-05	Slc9a5	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 5
10444244	3,766509061	2,93E-09	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
10461587	3,750131019	2,05E-05	Ms4a4a	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
10544133	3,71020268	5,56E-09	Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
10548333	3,697286907	0,00116802	Cd69	CD69 antigen
10389151	3,691182323	2,18E-08	Slfn10-ps	schlafen 10, pseudogene
10362091	3,670180457	0,003762773	Raet1d	retinoic acid early transcript delta
10368175	3,668456047	9,45E-09	Pde7b	phosphodiesterase 7B
10504670	3,662043682	1,38E-08	E230008N13Rik	RIKEN cDNA E230008N13 gene
10607484	3,584229458	0,004547997	Ptchd1	patched domain containing 1
10531972	3,553094353	1,06E-07	Gbp8	guanylate-binding protein 8

10410641	3,540958658	1,16E-07	Lrrc14b	leucine rich repeat containing 14B
10379511	3,525715343	2,97E-12	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
10444821	3,495985013	1,95E-07	H2-Q8	histocompatibility 2, Q region locus 8
10402347	3,492172925	0	Ifi2712a	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A
10448506	3,426210997	4,10E-07	Ccnf	cyclin F
10594110	3,400582753	0,001279886	Neo1	neogenin
10523134	3,3925263	1,51E-07	Pf4	platelet factor 4
10574135	3,390852431	0,020098727	Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5
10435457	3,373373354	2,10E-07	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
10416566	3,367318066	7,60E-07	Epsti1	epithelial stromal interaction 1 (breast)
10532019	3,341572093	0,015473471	Gbp11	guanylate binding protein 11
10452980	3,336420204	3,22E-07	Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
10533720	3,323427772	5,31E-07	Niacr1	niacin receptor 1
10567355	3,293864025	5,17E-06	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
10545086	3,282238331	0,042619584	Snca	synuclein, alpha
10492448	3,255470353	0,003257586	Ptx3	pentraxin related gene
10404606	3,231233481	3,70E-06	Ly86	lymphocyte antigen 86
10566144	3,138697517	7,74E-06	Trim21	tripartite motif-containing 21
10347948	3,13635964	1,82E-06	Sp100	nuclear antigen Sp100
10523138	3,105033858	3,44E-05	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
10581222	3,100397082	4,49E-06	Fhod1	formin homology 2 domain containing 1
10458046	3,09952255	5,81E-06	D0H4S114	DNA segment, human D4S114
10577882	3,089522757	4,14E-06	Hgsnat	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
10523012	3,062888821	5,03E-06	Dck	deoxycytidine kinase
10445953	3,029555216	0,000670445	Emr4	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 4
10475866	3,025660256	4,93E-06	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
10482517	2,970947271	1,44E-05	Nmi	N-myc (and STAT) interactor
10385504	2,934620605	6,74E-05	Gm5431	predicted gene 5431
10581605	2,917118514	0,000179032	Hp	haptoglobin
10429560	2,889005599	0,00013964	Ly6i	lymphocyte antigen 6 complex, locus I
10381408	2,885275338	4,06E-05	Ifi35	interferon-induced protein 35
10566574	2,88165176	3,97E-05	Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1
10439268	2,848169487	5,82E-05	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)
10346191	2,827558749	2,27E-05	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
10555862	2,796669943	0,000391781	Trim34	tripartite motif-containing 34
10429568	2,765694875	0,000155795	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
10496569	2,703949111	0,000226148	Gbp6	guanylate binding protein 6
10474700	2,703862898	0,000457822	Thbs1	thrombospondin 1
10566583	2,682890178	0,000138473	Gm8995	predicted gene 8995
10360377	2,682825091	1,56E-05	AI607873	expressed sequence AI607873
10566358	2,67727809	6,90E-05	Trim30a	tripartite motif-containing 30A

10445767	2,657920586	0,000952116	Trem12	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2
10351509	2,649316123	0,00057076	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV
10538206	2,639012163	0,030199131	Ccdc126	coiled-coil domain containing 126
10444814	2,620933956	0,00388853	H2-gs10	MHC class I like protein GS10
10500911	2,610575711	0,000991227	Mov10	Moloney leukemia virus 10
10346783	2,600467486	0,00453135	Cd28	CD28 antigen
10566578	2,596675976	0,001437398	Gm8979	very large inducible GTPase 1 pseudogene
10489850	2,587765701	0,001246174	Znfx1	zinc finger, NFX1-type containing 1
10356262	2,585108799	0,022244819	Csprs	component of Sp100-rs
10581813	2,56803702	0,001964076	Mlkl	mixed lineage kinase domain-like
10415319	2,552930035	0,005679933	Irf9	interferon regulatory factor 9
10450723	2,52864586	0,004081069	H2-T10	histocompatibility 2, T region locus 10
10526120	2,52254499	0,006313013	Tpst1	protein-tyrosine sulfotransferase 1
10596960	2,521990778	0,005217676	Trex1	three prime repair exonuclease 1
10458382	2,519474754	0,001854178	Cd14	CD14 antigen
10487823	2,480706404	0,003940685	Siglec1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
10577164	2,476483485	0,026726961	Gas6	growth arrest specific 6
10419854	2,455192255	0,00549237	Slc7a8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8
10466200	2,45362879	0,005193541	Ms4a7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
10379721	2,453446819	1,77E-06	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
10450694	2,449200699	0,005460461	H2-T22	histocompatibility 2, T region locus 22
10366043	2,426649931	0,007253719	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
10566050	2,374042891	0,028703827	Il18bp	interleukin 18 binding protein
10484371	2,370791845	0,01467209	Calcr1	calcitonin receptor-like
10525419	2,367604329	0,015592436	P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
10368101	2,367510789	0,034781366	D10Bwg1379e	DNA segment, Chr 10, Brigham & Women's Genetics 1379 expressed
10504672	2,35922661	0,015690982	Tdrd7	tudor domain containing 7
10398907	2,331955083	3,15E-05	Pld4	phospholipase D family, member 4
10582874	2,30911496	0,046650533	Sp110	Sp110 nuclear body protein
10583044	2,294751608	0,034453278	Mmp13	matrix metalloproteinase 13
10466210	2,28776997	0,004451516	Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D
10457385	2,278878487	0,048944412	Ccny	cyclin Y
10466127	2,150566883	0,048728036	AW112010	expressed sequence AW112010
10581378	2,129169788	0,006349482	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10
10424119	2,05684061	0,003293559	Nov	nephroblastoma overexpressed gene
10584572	2,015894306	0,00036341	Hspa8	heat shock protein 8
Probe Set ID	Fold Change F0 vs W0	Bonf F0 vs W0	Gene Symbol	Gene Description
10445141	-9,523896881	3,31E-12	Olfr111	olfactory receptor 111
10407792	-5,890377109	4,77E-21	Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene
10600988	-4,838114792	8,66E-12	Awat1	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1
10463476	-4,410670538	8,92E-14	Kazald1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
10467979	-4,0166479	1,31E-08	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
10463121	-3,477069731	0,037080594	Zfp518a	zinc finger protein 518A

10357261	-3,471923115	3,65E-07	Marco	macrophage receptor with collagenous structure
10541581	-3,249791138	1,62E-05	Clec4b1	C-type lectin domain family 4, member b1
10424349	-2,969802518	8,30E-06	Sqle	squalene epoxidase
10490246	-2,947810942	0,000161936	Gm14326	predicted gene 14326
10465990	-2,921683698	0,000848292	Tmem216	transmembrane protein 216
10498584	-2,913612466	0,028701017	Rarres1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
10585186	-2,906655315	7,30E-09	1600029D21Rik	RIKEN cDNA 1600029D21 gene
10430186	-2,897360096	0,010732933	Apol7c	apolipoprotein L 7c
10497265	-2,797398915	0,00019294	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
10596454	-2,747154405	4,51E-06	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1
10582626	-2,71688594	0,014450234	Abcb10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10
10527920	-2,703641754	0,000259112	Cyp51	cytochrome P450, family 51
10351644	-2,698781168	0,007696346	Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4
10490232	-2,680306526	0,004932847	Gm14403	predicted gene 14403
10554800	-2,642015627	0,043695827	Rab38	RAB38, member of RAS oncogene family
10463355	-2,55443283	0,000131751	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2
10482762	-2,543173696	0,004627384	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
10412466	-2,486063247	0,003011262	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
10470562	-2,481389138	0,004185109	Gm10134	predicted gene 10134
10573865	-2,469116656	0,0118566	Gm3579	predicted gene 3579
10449191	-2,465530329	0,006642007	Solh	small optic lobes homolog (Drosophila)
10461487	-2,456412756	0,001164539	Cybasc3	cytochrome b, ascorbate dependent 3
10465916	-2,439068033	0,007381227	Gm98	predicted gene 98
10578916	-2,438822904	0,001299274	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like
10540472	-2,420327039	0,000973302	Bhlhe40	basic helix-loop-helix family, member e40
10594774	-2,414457385	0,009284941	Ccnb2	cyclin B2
10379736	-2,35257057	0,001425568	1100001G20Rik	RIKEN cDNA 1100001G20 gene
10506571	-2,290524509	0,010342022	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase
10421810	-2,262908107	0,042756086	1190002H23Rik	RIKEN cDNA 1190002H23 gene
10466712	-2,228717871	0,043043667	Mamdc2	MAM domain containing 2
10574226	-2,077689404	0,016243927	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17

## ANNEXE 2

**Table S2:** List of 281 genes differentially expressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 1h as determined by microarray analysis in 3 biological replicates performed in triplicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni)

Probe Set ID	Fold Change F1 vs W1	Bonf F1 vs W1	Gene Symbol	Gene Description
10462618	77,63476857	0	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
10462621	75,69310585	0	I830012O16Rik	RIKEN cDNA I830012O16 gene
10462623	63,88033618	0	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
10462613	61,1050199	0	Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
10502791	52,37215265	0	Ifi44	interferon-induced protein 44
10434778	46,48988655	0	Rtp4	receptor transporter protein 4
10569102	41,56726728	0	Irf7	interferon regulatory factor 7
10360406	31,13876885	0	Ifi205	interferon activated gene 205
10379633	29,70619664	0	Slfn1	schlafen 1
10399710	27,23666202	0	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
10514285	23,85998118	0	Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast
10461622	22,51798765	0	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
10524621	18,11529005	0	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
10451287	17,84009014	0	Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier
10541307	17,31781487	0	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
10360373	16,97016868	0	E030037K03Rik	RIKEN cDNA E030037K03 gene
10502801	15,79329181	0	H28	histocompatibility 28
10458843	15,49172616	0	Sema6a	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
10461594	14,84330035	0	Ms4a4c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C
10533213	14,69647239	0	Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
10531994	14,60765811	0	Mpa2l	macrophage activation 2 like
10437224	14,50361873	0	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
10351873	14,22536732	0	Pyhin1	pyrin and HIN domain family, member 1
10385533	14,21106725	0	Tgtp1	T-cell specific GTPase 1
10507143	13,91292641	0	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a
10531987	13,82836803	0	Gbp4	guanylate binding protein 4
10531980	13,64208262	0	Gbp9	guanylate-binding protein 9
10374197	13,51864828	0	Ramp3	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3
10507152	12,15011446	0	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B
10376324	11,80708563	0	Gm12250	predicted gene 12250
10395039	11,69083443	0	Cmpk2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
10420483	11,67877459	0	Phf11	PHD finger protein 11
10420488	11,67569076	0	D14Ert668e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed
10383208	10,43257943	0	Rnf213	ring finger protein 213
10533198	10,34537474	0	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2

10524310	10,06141982	0	Ttc28	tetratricopeptide repeat domain 28
10406581	9,906970801	0	Dhfr	dihydrofolate reductase
10360382	9,659255529	0	Ifi204	interferon activated gene 204
10566366	9,615207554	0	Trim30d	tripartite motif-containing 30D
10378068	9,591390611	0	Xaf1	XIAP associated factor 1
10398039	9,490716452	0	Serpina3f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F
10571984	9,340935216	0	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
10524631	9,279325874	0	Oasl1	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
10531415	9,156790403	0	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
10389143	8,959461357	0	Slfn8	schlafen 8
10376326	8,753639677	0	Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2
10379518	8,570313626	0	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
10496580	8,418580537	0	Gbp3	guanylate binding protein 3
10496539	8,405327309	0	Gbp5	guanylate binding protein 5
10351880	8,327185717	0	E430029J22Rik	RIKEN cDNA E430029J22 gene
10455954	7,658622879	0	Gm4951 // Gm4951	predicted gene 4951 // predicted gene 4951
10379636	7,654196826	2,08E-11	Slfn4	schlafen 4
10569017	7,594715911	0	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
10500335	7,56429695	0	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
10444824	7,491185256	0	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6
10429564	7,324158437	0	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
10461614	7,252844912	0	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
10391207	7,163655699	0	Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
10375515	6,999558857	0	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47
10581266	6,931722982	0	Tppp3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3
10385500	6,864182925	0	Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1
10569494	6,844726995	0	Tnfrsf22	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22
10533246	6,823207071	0	Oasl1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G
10490150	6,565282087	0	Zbp1	Z-DNA binding protein 1
10496592	6,266682929	0	Gbp2	guanylate binding protein 2
10441233	6,08734022	2,90E-09	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
10360391	6,063110014	0	Ifi203	interferon activated gene 203
10379615	6,007730098	0	Slfn5	schlafen 5
10410931	5,930969694	0	Vcan	versican
10349157	5,881267049	0	Serpib2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2
10461587	5,785838284	2,02E-10	Ms4a4a	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
10350516	5,78527284	0	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
10379530	5,732692916	7,54E-08	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12
10473356	5,686642067	0	Ube216	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
10512067	5,51323845	0	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
10450675	5,470315338	0	H2-T24	histocompatibility 2, T region locus 24
10453747	5,264658676	0	Colec12	collectin sub-family member 12
10579532	5,053360137	0	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2
10368175	5,028499621	0	Pde7b	phosphodiesterase 7B
10563597	5,021442974	0	Saa3	serum amyloid A 3
10455961	4,945944326	1,43E-09	Iigp1	interferon inducible GTPase 1
10444821	4,86604614	0	H2-Q8	histocompatibility 2, Q region locus 8
10530692	4,85315521	1,72E-05	Kdr	kinase insert domain protein receptor
10525158	4,849812594	7,83E-06	Oasl1b	2'-5' oligoadenylate synthetase 1B



10496555	4,737316298	0	Gbp1	guanylate binding protein 1
10533256	4,709823513	0	Oas1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A
10453759	4,689181106	6,20E-08	Gm10554	predicted gene 10554
10475866	4,651680471	0	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
10574780	4,502686396	8,90E-12	Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
10439249	4,381716063	0	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
10574102	4,331780078	0	Nlrc5	NLR family, CARD domain containing 5
10349166	4,313305793	1,54E-06	Serp1b10-ps	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10, pseudogene
10483828	4,306309465	1,13E-05	Pde11a	phosphodiesterase 11A
10409579	4,270307617	0	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
10360370	4,235513829	0,000282636	BC094916	cDNA sequence BC094916
10574727	4,170279271	5,33E-05	Slc9a5	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 5
10411019	4,128251887	6,52E-11	Msh3	mutS homolog 3 (E. coli)
10538590	4,122552882	0	Herc6	hect domain and RLD 6
10483110	4,058613614	0	Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1
10402347	4,016049357	0	Ifi2712a	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A
10467149	3,999412254	5,86E-05	2010002M12Rik	RIKEN cDNA 2010002M12 gene
10429560	3,987891062	0	Ly6i	lymphocyte antigen 6 complex, locus I
10385504	3,96623456	0	Gm5431	predicted gene 5431
10532019	3,939981894	0,002291056	Gbp11	guanylate binding protein 11
10554240	3,934357348	2,25E-09	Isg20	interferon-stimulated protein
10490632	3,918153721	0	BC006779	cDNA sequence BC006779
10607484	3,890056205	0,003328639	Ptchd1	patched domain containing 1
10367224	3,869810712	0	Stat2	signal transducer and activator of transcription 2
10544133	3,815351565	0	Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
10379511	3,792799216	0	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
10569504	3,791477076	0	Tnfrsf23	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23
10523151	3,764366249	0	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
10444244	3,718954249	0	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
10416837	3,709693515	0	Irg1	immunoresponsive gene 1
10458046	3,695342281	0	D0H4S114	DNA segment, human D4S114
10446229	3,594076209	5,93E-12	Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
10448506	3,555543237	5,93E-12	Ccnf	cyclin F
10526120	3,5208823	3,86E-11	Tpst1	protein-tyrosine sulfotransferase 1
10435457	3,50317	1,19E-11	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
10360377	3,455666518	0	AI607873	expressed sequence AI607873
10581222	3,426795265	6,82E-11	Fhod1	formin homology 2 domain containing 1
10439268	3,426248995	2,67E-11	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)
10504670	3,417591585	6,23E-11	E230008N13Rik	RIKEN cDNA E230008N13 gene
10523134	3,375997884	3,56E-11	Pf4	platelet factor 4
10474936	3,374638581	0	Spint1	serine protease inhibitor, Kunitz type 1
10410641	3,365260066	5,69E-10	Lrrc14b	leucine rich repeat containing 14B
10542872	3,356400792	3,21E-09	Rps4y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2
10347948	3,303025254	2,67E-11	Sp100	nuclear antigen Sp100
10548333	3,2656496	1,39E-09	Cd69	CD69 antigen
10389151	3,250059206	6,73E-10	Slfn10-ps	schlafen 10, pseudogene
10451054	3,181479885	2,41E-05	Enpp4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4
10360306	3,180042397	0,000622473	Slamf8	SLAM family member 8
10368644	3,175722824	0,020348274	Fam26f	family with sequence similarity 26, member F

10597279	3,154967186	0	Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2
10596960	3,14108939	3,00E-09	Trex1	three prime repair exonuclease 1
10567355	3,117278387	9,02E-09	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
10566144	3,110188455	1,20E-08	Trim21	tripartite motif-containing 21
10566578	3,068564694	7,67E-09	Gm8979	very large inducible GTPase 1 pseudogene
10523012	3,059693202	3,85E-09	Dck	deoxycytidine kinase
10566358	3,026792971	2,97E-12	Trim30a	tripartite motif-containing 30A
10488060	3,017324792	3,23E-08	Jag1	jagged 1
10523138	2,988828257	1,78E-11	Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3
10415319	2,970982279	5,85E-08	Irf9	interferon regulatory factor 9
10452980	2,965573236	3,50E-08	Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
10379721	2,961011308	0	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
10444814	2,942721476	7,13E-08	H2-gs10	MHC class I like protein GS10
10584572	2,932558728	0	Hspa8	heat shock protein 8
10496569	2,922651883	1,01E-08	Gbp6	guanylate binding protein 6
10346783	2,918514023	7,87E-08	Cd28	CD28 antigen
10346191	2,895354502	7,59E-10	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
10356262	2,894818707	1,35E-05	Csprs	component of Sp100-rs
10566574	2,888326829	5,05E-08	Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1
10445953	2,887766314	1,29E-05	Emr4	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 4
10542885	2,870533714	6,68E-09	2810474O19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene
10429568	2,842798809	1,06E-07	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
10351095	2,841126365	0,000413403	Tnfsf4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
10489850	2,836700818	2,84E-07	Znfx1	zinc finger, NFX1-type containing 1
10445746	2,825092294	6,26E-07	Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
10482517	2,81713949	1,60E-07	Nmi	N-myc (and STAT) interactor
10351509	2,787882968	2,02E-07	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV
10531972	2,776699396	9,86E-07	Gbp8	guanylate-binding protein 8
10381408	2,750223756	8,28E-07	Ifi35	interferon-induced protein 35
10583112	2,703752324	0,017247388	Mmp27	matrix metalloproteinase 27
10519983	2,699435976	3,72E-06	Fgl2	fibrinogen-like protein 2
10454782	2,692719589	4,72E-06	Egr1	early growth response 1
10371502	2,680600082	3,96E-06	Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
10581605	2,643239223	6,14E-06	Hp	haptoglobin
10487823	2,634733422	2,28E-06	Siglec1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
10421172	2,632407797	7,26E-06	Slc25a37	solute carrier family 25, member 37
10416566	2,615496791	1,34E-05	Epsti1	epithelial stromal interaction 1 (breast)
10582874	2,591501089	1,23E-05	Sp110	Sp110 nuclear body protein
10520452	2,585520959	2,19E-05	Il6	interleukin 6
10555862	2,582010737	1,67E-05	Trim34	tripartite motif-containing 34
10500911	2,574483457	1,64E-05	Mov10	Moloney leukemia virus 10
10513729	2,550816291	2,73E-05	Tnfsf8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
10577882	2,547930631	1,63E-05	Hgsnat	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
10466200	2,494256787	2,12E-05	Ms4a7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7
10389134	2,491467923	7,11E-05	Slfn9	schlafen 9
10382846	2,488635603	2,83E-05	BC018473	cDNA sequence BC018473
10354054	2,448279045	0,000159167	Mitd1	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
10474700	2,442825821	0,00010315	Thbs1	thrombospondin 1
10466127	2,439884746	1,28E-09	AW112010	expressed sequence AW112010
10566050	2,426564149	0,000210314	Il18bp	interleukin 18 binding protein

10560481	2,423600654	0,000243046	Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B
10460767	2,38862272	0,00198508	Batf2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2
10525419	2,386870012	0,000289507	P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
10601456	2,348508801	0,000416609	Gm6377	predicted gene 6377
10404606	2,345557714	0,000744256	Ly86	lymphocyte antigen 86
10533720	2,342293722	0,000242455	Niacr1	niacin receptor 1
10548552	2,342171958	0,000779708	Klra2	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2
10508465	2,329669015	0,000222658	Mareksl1	MARCKS-like 1
10585048	2,328769743	0,000253615	Cadm1	cell adhesion molecule 1
10379646	2,319738207	0,001095468	Slfn3	schlafen 3
10597758	2,315148925	0,000893336	Csrnp1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1
10514275	2,292695883	0,000534109	Ptplad2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
10376513	2,288459881	0,000704117	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3
10450694	2,285384644	0,000578917	H2-T22	histocompatibility 2, T region locus 22
10429573	2,282016147	0,001757093	Ly6c2	lymphocyte antigen 6 complex, locus C2
10450723	2,248230569	0,00247639	H2-T10	histocompatibility 2, T region locus 10
10368616	2,244586975	0,003891742	Zufsp	zinc finger with UFM1-specific peptidase domain
10484371	2,243617903	0,001493653	Calcr1	calcitonin receptor-like
10439936	2,242229577	0,000196706	Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
10445767	2,222303717	0,003749338	Trem12	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2
10588786	2,217146345	0,028189637	Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7
10544982	2,210123518	0,005072771	Nt5c3	5'-nucleotidase, cytosolic III
10566346	2,20330772	0,005540457	9230105E10Rik	RIKEN cDNA 9230105E10 gene
10575120	2,199221628	0,004933437	Sntb2	syntrophin, basic 2
10457385	2,193635768	0,00129095	Ccny	cyclin Y
10581813	2,182957435	0,005441108	Mlkl	mixed lineage kinase domain-like
10552252	2,175006933	0,015473559	1600014C10Rik	RIKEN cDNA 1600014C10 gene
10479411	2,172823518	0,008151416	Ogfr	opioid growth factor receptor
10478875	2,169389345	0,003105418	Rnf114	ring finger protein 114
10584561	2,166516163	0,012096251	9030425E11Rik	RIKEN cDNA 9030425E11 gene
10433101	2,156228393	0,007072206	Gpr84	G protein-coupled receptor 84
10398907	2,154883687	3,32E-07	Pld4	phospholipase D family, member 4
10452815	2,150993254	0,008500462	Xdh	xanthine dehydrogenase
10512949	2,150030313	0,012100569	Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
10566583	2,13643141	0,001061114	Gm8995	predicted gene 8995
10458382	2,129345418	6,18E-07	Cd14	CD14 antigen
10418171	2,100688139	0,028384179	Zcchc24	zinc finger, CCHC domain containing 24
10424119	2,093649588	6,34E-07	Nov	nephroblastoma overexpressed gene
10542378	2,086458174	0,011676718	Atf7ip	activating transcription factor 7 interacting protein
10598994	2,085509668	1,98E-07	Atp1b3	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 3 polypeptide
10440288	2,075549012	0,035674509	Zfp654	zinc finger protein 654
10504672	2,070637489	0,02453405	Tdrd7	tudor domain containing 7
10533304	2,06445361	0,014808026	Trafd1	TRAF type zinc finger domain containing 1
10444890	2,058958855	7,56E-05	Ier3	immediate early response 3
10583044	2,055003712	0,019509679	Mmp13	matrix metalloproteinase 13
Probe Set ID	Fold Change F1 vs W1	Bonf F1 vs W1	Gene Symbol	Gene Description
10360398	-7,93080329	4,55E-16	Ifi202b	interferon activated gene 202B
10357261	-7,243294329	5,54E-31	Marco	macrophage receptor with collagenous structure
10445141	-5,851996879	6,85E-12	Olf111	olfactory receptor 111
10467979	-4,067826085	2,48E-14	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1

10424349	-3,987282986	1,98E-17	Sqle	squalene epoxidase
10600988	-3,947553996	2,12E-12	Awat1	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1
10497265	-3,470785002	6,29E-13	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
10527920	-3,368590362	3,72E-13	Cyp51	cytochrome P450, family 51
10541581	-3,273908496	4,04E-10	Clec4b1	C-type lectin domain family 4, member b1
10506571	-3,11319296	1,94E-11	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase
10408557	-3,027565138	9,06E-08	Serpinb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a
10415885	-2,996077619	0,005037602	Sox7	SRY-box containing gene 7
10490246	-2,940576453	4,83E-08	Gm14326	predicted gene 14326
10463476	-2,892512111	3,12E-09	Kazald1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
10571399	-2,866773652	3,45E-06	Zdhhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2
10463355	-2,821880706	9,92E-10	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2
10529824	-2,819634182	0,011607688	Prom1	prominin 1
10499483	-2,806019432	3,99E-08	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase
10582310	-2,790566448	7,62E-08	Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase
10465895	-2,759343379	0,000578028	Fads2	fatty acid desaturase 2
10463121	-2,758691249	0,038323452	Zfp518a	zinc finger protein 518A
10565819	-2,707454326	0,000153166	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1
10407792	-2,699626836	5,50E-08	Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene
10596454	-2,686364369	1,46E-08	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1
10403413	-2,630778892	2,39E-06	Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
10359917	-2,592510802	4,74E-05	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
10351644	-2,561022628	0,000205976	Cd244	CD244 natural killer cell receptor 2B4
10578916	-2,552080789	6,96E-07	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like
10605034	-2,502394072	0,014212969	Xlr4c	X-linked lymphocyte-regulated 4C
10465916	-2,498962063	4,52E-06	Gm98	predicted gene 98
10592585	-2,488701153	6,40E-06	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S, cerevisiae)
10461487	-2,474707475	3,38E-06	Cybas3	cytochrome b, ascorbate dependent 3
10461408	-2,448338441	2,30E-05	Rab3il1	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1
10490232	-2,393639686	0,00063702	Gm14403	predicted gene 14403
10466712	-2,385272346	2,11E-05	Mamdc2	MAM domain containing 2
10416850	-2,384645811	0,001044432	Scel	sciellin
10420730	-2,369493987	1,76E-05	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
10412466	-2,35184503	3,35E-05	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
10574226	-2,338218902	1,25E-08	Ccl17	chemokine (C-C motif) ligand 17
10348062	-2,326781922	0,000160394	B3gnt7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7
10465990	-2,280395406	0,01732696	Tmem216	transmembrane protein 216
10458033	-2,276717043	0,001055538	Stard4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
10585186	-2,267417407	5,42E-09	1600029D21Rik	RIKEN cDNA 1600029D21 gene
10462881	-2,222245183	0,01924303	Gpr120	G protein-coupled receptor 120
10552369	-2,211642192	0,001124403	Siglec5	sialic acid binding Ig-like lectin 5
10389022	-2,199709485	0,002293753	Myo1d	myosin ID
10379736	-2,183797373	0,000248259	1100001G20Rik	RIKEN cDNA 1100001G20 gene
10404885	-2,114144519	0,002935668	Gmpr	guanosine monophosphate reductase
10355536	-2,103463815	0,003733297	Tns1	tensin 1
10449191	-2,067942398	0,014242499	Solh	small optic lobes homolog (Drosophila)
10367400	-2,05669662	0,004800568	Mmp19	matrix metalloproteinase 19
10583732	-2,043101673	0,010481283	Ldlr	low density lipoprotein receptor
10520521	-2,006887854	0,040877922	Cenpa	centromere protein A

## ANNEXE 3

**Table S3:** List of 880 genes differentially expressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 6h as determined by microarray analysis in 3 biological replicates performed in triplicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Bonferroni)

Probe Set ID	Fold Change F6 vs W6	Bonf F6 vs W6	Gene Symbol	Gene Description
10514285	171,2500976	0	Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast
10491091	67,22691306	0	Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
10351880	48,98183781	0	E430029J22Rik	RIKEN cDNA E430029J22 gene
10379530	48,75728878	0	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12
10445347	47,17661495	0	Clic5	chloride intracellular channel 5
10455961	46,94563118	0	Iigp1	interferon inducible GTPase 1
10379518	42,37589694	0	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
10360373	34,88698458	0	E030037K03Rik	RIKEN cDNA E030037K03 gene
10379636	34,5034328	0	Slfn4	schlafen 4
10531420	31,88458061	0	Cxcl11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
10379228	29,87984999	0	Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible
10462621	26,75702847	0	I830012O16Rik	RIKEN cDNA I830012O16 gene
10554240	25,71196562	0	Isg20	interferon-stimulated protein
10531980	23,48033359	0	Gbp9	guanylate-binding protein 9
10531987	23,17613358	0	Gbp4	guanylate binding protein 4
10458843	22,75749723	0	Sema6a	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
10500335	22,39053352	0	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
10461594	20,03879706	0	Ms4a4c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C
10420483	18,828537	0	Phf11	PHD finger protein 11
10461622	18,54057395	0	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
10379633	17,42057091	0	Slfn1	schlafen 1
10368644	16,8159922	0	Fam26f	family with sequence similarity 26, member F
10530692	16,40378688	0	Kdr	kinase insert domain protein receptor
10566366	15,68996251	0	Trim30d	tripartite motif-containing 30D
10385518	15,60078804	0	Tgtp1	T-cell specific GTPase 1
10360370	15,0491907	0	BC094916	cDNA sequence BC094916
10395039	14,85228501	0	Cmpk2	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial
10502801	14,3587176	0	H28	histocompatibility 28
10531407	14,05406918	0	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
10417526	13,3132971	0	Dnase113	deoxyribonuclease 1-like 3
10368175	13,12512266	0	Pde7b	phosphodiesterase 7B
10398039	12,2799774	0	Serpina3f	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F
10548345	12,14029859	0	Klrl1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
10532019	12,12463994	0	Gbp11	guanylate binding protein 11
10441601	11,95756725	0	Tagap	T-cell activation Rho GTPase-activating protein
10411235	11,89982127	0	Iqgap2	IQ motif containing GTPase activating protein 2
10437224	11,76652167	0	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
10571984	11,75555706	0	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60

10533213	11,58088017	0	Oas3	2'-5' oligoadenylate synthetase 3
10567987	11,48846385	0	Il27	interleukin 27
10507152	11,46981328	0	Cyp4a12b	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12B
10513729	11,45111136	0	Tnfsf8	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
10451054	11,43855574	0	Enpp4	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4
10379511	11,35646561	0	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
10507143	11,33562474	0	Cyp4a12a	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a
10469289	10,90181169	0	Il15ra	interleukin 15 receptor, alpha chain
10420488	10,81926808	0	D14Ertd668e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 668, expressed
10487238	10,68314116	0	Hdc	histidine decarboxylase
10441233	10,57129343	0	Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
10360406	10,11557203	0	Ifi205	interferon activated gene 205
10598152	10,04071429	0	LOC625360	2-cell-stage, variable group, member 3-like
10430174	9,828293901	0	Apo19a	apolipoprotein L 9a
10524631	9,748140197	0	Oas1l	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1
10356291	9,668030336	0	A530040E14Rik	RIKEN cDNA A530040E14 gene
10460767	9,594874924	0	Batf2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2
10385507	9,574419376	0	Gm12185	predicted gene 12185
10531972	9,527475545	0	Gbp8	guanylate-binding protein 8
10531342	9,498587556	0	U90926	cDNA sequence U90926
10404783	9,279962658	0	Edn1	endothelin 1
10574098	9,188453097	0	Nlr5	NLR family, CARD domain containing 5
10406581	9,148498626	0	Dhfr	dihydrofolate reductase
10607950	9,127400269	0	G530011O06Rik	RIKEN cDNA G530011O06 gene
10383212	9,04576803	0	Rnf213	ring finger protein 213
10374197	9,025025448	0	Ramp3	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3
10548333	8,921980531	0	Cd69	CD69 antigen
10475866	8,789706545	0	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
10455954	8,653351462	0	Gm4951 // Gm4951	predicted gene 4951 // predicted gene 4951
10569102	8,52988919	0	Irf7	interferon regulatory factor 7
10425049	8,508807772	0	Apo19b	apolipoprotein L 9b
10351099	8,476437192	0	Tnfsf18	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
10577655	8,294540148	0	Ido1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
10526120	7,991088322	0	Tp53	protein-tyrosine sulfotransferase 1
10461587	7,860979023	0	Ms4a4a	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A
10531994	7,539600074	0	Mpa2l	macrophage activation 2 like
10578493	7,436702194	0	Tlr3	toll-like receptor 3
10475487	7,265454246	1,13E-10	Slc28a2	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2
10579958	7,205052786	0	Il15	interleukin 15
10511588	7,129559784	0	Tmem67	transmembrane protein 67
10541307	7,092557787	0	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
10483828	7,087289593	5,04E-11	Pde11a	phosphodiesterase 11A
10444824	7,042384512	0	H2-Q6	histocompatibility 2, Q region locus 6
10497731	6,969702131	8,39E-10	Ccdc39	coiled-coil domain containing 39
10420497	6,954404581	2,97E-12	Gm6907	predicted gene 6907
10569494	6,846240627	0	Tnfrsf22	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22
10545921	6,827020103	0	Mxd1	MAX dimerization protein 1

10519983	6,720446093	0	Fgl2	fibrinogen-like protein 2
10566050	6,54178797	0	Il18bp	interleukin 18 binding protein
10533198	6,538011886	0	Oas2	2'-5' oligoadenylate synthetase 2
10471833	6,492405005	0	Lhx2	LIM homeobox protein 2
10502791	6,456556805	0	Ifi44	interferon-induced protein 44
10351873	6,425964452	0	Pyhin1	pyrin and HIN domain family, member 1
10411459	6,377044727	5,34E-11	Tmem171	transmembrane protein 171
10594053	6,302617021	0	Pml	promyelocytic leukemia
10448506	6,295705255	0	Ccnf	cyclin F
10376324	6,242063354	0	Gm12250	predicted gene 12250
10542040	6,153204752	0	Parp11	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11
10416566	6,146801941	0	Epsti1	epithelial stromal interaction 1 (breast)
10459210	6,11487073	9,49E-11	Arhgef37	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 37
10545001	6,028750397	0	Ppm1k	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)
10462613	5,876507526	0	Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
10467149	5,868366601	3,16E-08	2010002M12Rik	RIKEN cDNA 2010002M12 gene
10500911	5,864881667	0	Mov10	Moloney leukemia virus 10
10351095	5,834423055	0	Tnfsf4	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
10490150	5,683217779	0	Zbp1	Z-DNA binding protein 1
10567355	5,654263041	0	Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
10411019	5,651387053	2,07E-09	Msh3	mutS homolog 3 (E. coli)
10523151	5,611564309	0	Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
10524621	5,575653858	0	Oasl2	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2
10520452	5,530228149	0	Il6	interleukin 6
10356470	5,485560352	1,06E-06	Glrp1	glutamine repeat protein 1
10403273	5,450871839	0	Asb13	ankyrin repeat and SOCS box-containing 13
10453747	5,4268085	0	Colec12	collectin sub-family member 12
10462618	5,381502406	0	Ifit3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
10566144	5,346089536	0	Trim21	tripartite motif-containing 21
10461629	5,339401361	2,85E-06	Ms4a4d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4D
10385504	5,33224844	0	Gm5431	predicted gene 5431
10538590	5,310239757	0	Herc6	hect domain and RLD 6
10391207	5,309422687	0	Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58
10407982	5,293569969	0	A530099J19Rik	RIKEN cDNA A530099J19 gene
10588786	5,267819818	0	Uba7	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7
10456522	5,211154398	0	Tcf4	transcription factor 4
10399710	5,187250352	0	Rsad2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
10389134	5,184895815	0	Slfn9	schlafen 9
10429564	5,184342385	0	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
10473356	5,141096172	0	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
10478678	5,110551548	0	Cd40	CD40 antigen
10376326	5,07643254	0	Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2
10445767	5,040200062	0	Trem12	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2
10564343	4,946870044	1,90E-05	Tjp1	tight junction protein 1
10450675	4,893826654	0	H2-T24	histocompatibility 2, T region locus 24
10490632	4,888985071	0	BC006779	cDNA sequence BC006779
10444821	4,879295979	0	H2-Q8	histocompatibility 2, Q region locus 8
10564631	4,87335392	0	Slco3a1	solute carrier organic anion transporter family, member 3a1
10409866	4,862782281	7,52E-06	Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta

10451646	4,836445025	1,72E-05	A530064D06Rik	RIKEN cDNA A530064D06 gene
10522744	4,828924811	0	Mthfr	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
10469571	4,820704507	2,70E-09	Otud1	OTU domain containing 1
10514255	4,815067424	0	Mllt3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3
10462683	4,78520589	0	Pcgf5	polycomb group ring finger 5
10452815	4,765356013	0	Xdh	xanthine dehydrogenase
10583044	4,753456638	0	Mmp13	matrix metalloproteinase 13
10496580	4,74754936	0	Gbp3	guanylate binding protein 3
10529824	4,728599649	0	Prom1	prominin 1
10405432	4,719964471	0	Rgs14	regulator of G-protein signaling 14
10389143	4,718865332	0	Slfn8	schlafen 8
10534909	4,71365118	0	Sp110	Sp110 nuclear body protein
10544891	4,681396623	0	Nod1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
10444244	4,613050225	0	Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
10385500	4,59591463	0	Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1
10461614	4,588288159	0	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
10487879	4,563118121	0	Rnf24	ring finger protein 24
10513256	4,541963146	1,48E-11	Lpar1	lysophosphatidic acid receptor 1
10351509	4,53879082	0	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV
10569168	4,518293536	0	Slc25a22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, glutamate), member 22
10524310	4,513103924	0,000101809	Ttc28	tetratricopeptide repeat domain 28
10506786	4,468612669	0	Zcchc11	zinc finger, CCHC domain containing 11
10451287	4,468318425	0	Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier
10569017	4,46017402	0	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
10429843	4,459824688	0	Parp10	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10
10381408	4,447411817	0	Ifi35	interferon-induced protein 35
10446986	4,42812209	0	Crim1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin like)
10581813	4,400126498	0	Mlk1	mixed lineage kinase domain-like
10544982	4,392572201	0	Nt5c3	5'-nucleotidase, cytosolic III
10595404	4,387782458	0	Fam46a	family with sequence similarity 46, member A
10420503	4,363379633	0	Setdb2	SET domain, bifurcated 2
10566574	4,350098293	0	Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1
10444814	4,349453076	0	H2-gs10	MHC class I like protein GS10
10545154	4,343412578	1,35E-05	Il23r	interleukin 23 receptor
10533246	4,341946652	0	Oas1g	2'-5' oligoadenylate synthetase 1G
10441244	4,324112326	5,14E-06	Fam3b	family with sequence similarity 3, member B
10437668	4,323168297	0	Socs1	suppressor of cytokine signaling 1
10404606	4,214393425	0	Ly86	lymphocyte antigen 86
10552252	4,206361959	0	1600014C10Rik	RIKEN cDNA 1600014C10 gene
10402585	4,205749722	0	Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase
10354521	4,199451772	8,90E-12	Inpp1	inositol polyphosphate-1-phosphatase
10587226	4,189970249	0,000227728	Lysmd2	LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 2
10542677	4,18087526	0	Etnk1	ethanolamine kinase 1
10379389	4,161351054	0	Adap2	ArfGAP with dual PH domains 2
10533849	4,146042772	0	Rilpl1	Rab interacting lysosomal protein-like 1
10439312	4,136934169	0	Cd86	CD86 antigen
10410931	4,134560556	0	Vcan	versican



10523012	4,129974861	0	Dck	deoxycytidine kinase
10402347	4,074652425	0	Ifi2712a	interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A
10375515	4,038644055	0	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47
10474064	4,024202767	0	Trp53i11	transformation related protein 53 inducible protein 11
10368616	4,005351901	0	Zufsp	zinc finger with UFM1-specific peptidase domain
10601456	3,987379719	0	Gm6377	predicted gene 6377
10389680	3,977797958	6,57E-09	Msi2	Musashi homolog 2 (Drosophila)
10525158	3,975978622	0	Oas1b	2'-5' oligoadenylate synthetase 1B
10504606	3,941937767	0	Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
10378068	3,936288601	0	Xaf1	XIAP associated factor 1
10474141	3,930347845	0	Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
10531415	3,90808	0	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
10360306	3,903539856	0	Slamf8	SLAM family member 8
10579532	3,89893472	0	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2
10444268	3,893662938	0	Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
10544133	3,893590069	0	Parp12	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12
10581246	3,886075688	0,00341365	Kctd19	potassium channel tetramerisation domain containing 19
10511703	3,875955481	0	Ripk2	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2
10553788	3,845081026	0	Atp10a	ATPase, class V, type 10A
10444056	3,842565894	0	Daxx	Fas death domain-associated protein
10482517	3,841916064	0	Nmi	N-myc (and STAT) interactor
10500982	3,823614296	0	I830077J02Rik	RIKEN cDNA I830077J02 gene
10420320	3,811822656	2,67E-11	Cenpj	centromere protein J
10462623	3,789742958	0	Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
10476395	3,787573801	0,000971782	Bmp2	bone morphogenetic protein 2
10361828	3,765002962	0	Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
10453678	3,738244677	2,76E-10	Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1
10569504	3,734781909	0	Tnfrsf23	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23
10379615	3,727328569	0	Slfn5	schlafen 5
10401564	3,725383635	0	1110018G07Rik	RIKEN cDNA 1110018G07 gene
10358408	3,724838822	0	Rgs1	regulator of G-protein signaling 1
10533256	3,700209612	0	Oas1a	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A
10483110	3,697391982	0	Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1
10522182	3,675042668	0	Rhoh	ras homolog gene family, member H
10356248	3,674217421	0	C130026I21Rik	RIKEN cDNA C130026I21 gene
10380999	3,669084168	0,001766303	Csf3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
10607484	3,66857556	0,002174707	Ptchd1	patched domain containing 1
10512766	3,663241972	0	Trim14	tripartite motif-containing 14
10374485	3,659896879	0	Peli1	pellino 1
10602704	3,648883273	0,001469289	Klf8	Kruppel-like factor 8
10462005	3,648395167	0	Tmem2	transmembrane protein 2
10469255	3,609454956	0,001054484	Prkcc	protein kinase C, theta
10582879	3,601572634	0,005646475	Csprs	component of Sp100-rs
10367224	3,599872974	0	Stat2	signal transducer and activator of transcription 2
10467041	3,595194942	0	Asah2	N-acylsphingosine amidohydrolase 2
10439936	3,565360605	0	Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
10375578	3,554059908	0,002942704	Flt4	FMS-like tyrosine kinase 4

10474181	3,553389903	5,93E-12	Abtb2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2
10466374	3,552099514	0	Tle4	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E(spl)
10516950	3,549977793	0	Xkr8	X Kell blood group precursor related family member 8 homolog
10485624	3,542463529	0,019413788	Prrg4	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)
10540408	3,537852744	0,002948147	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1
10516966	3,537031335	0	BC013712	cDNA sequence BC013712
10574342	3,519442706	0	AA960436	expressed sequence AA960436
10496539	3,506605175	0	Gbp5	guanylate binding protein 5
10379401	3,500618878	2,67E-11	Rnf135	ring finger protein 135
10583485	3,472031412	1,81E-06	A230050P20Rik	RIKEN cDNA A230050P20 gene
10459772	3,470705612	0,004044473	Lipg	lipase, endothelial
10489127	3,460604331	2,97E-12	Rbl1	retinoblastoma-like 1 (p107)
10582862	3,428494006	0	Arhgef12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12
10350516	3,416620477	0	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
10395659	3,413673314	0,033446665	Coch	coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)
10581266	3,408157481	0,000607337	Tppp3	tubulin polymerization-promoting protein family member 3
10349157	3,404209912	0	Serpinb2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2
10356271	3,38434818	0	A530032D15Rik	RIKEN cDNA A530032D15Rik gene
10497689	3,38354834	5,34E-11	Gnb4	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 4
10513008	3,377933672	8,90E-12	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)
10588479	3,375202357	1,24E-06	Tlr9	toll-like receptor 9
10450733	3,367159355	0,000331472	H2-t9	MHC class Ib T9
10478875	3,357122078	0	Rnf114	ring finger protein 114
10356269	3,355414509	0	Sp140	Sp140 nuclear body protein
10571696	3,355044728	9,49E-11	Casp3	caspace 3
10498802	3,344222878	5,93E-12	Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
10350790	3,313883763	5,93E-12	Tor1aip2	torsin A interacting protein 2
10489850	3,309994913	0	Znfx1	zinc finger, NFX1-type containing 1
10512067	3,303302293	0	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
10409579	3,300512358	6,05E-10	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
10479411	3,286787078	2,97E-12	Ogfr	opioid growth factor receptor
10492402	3,28502648	0,032249464	Kcnab1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
10534041	3,263701243	1,19E-11	Stx2	syntaxin 2
10500434	3,261955272	2,97E-11	Bcl9	B-cell CLL/lymphoma 9
10462791	3,257075134	0	March5	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5
10517465	3,247946796	0	Kdm1a	lysine (K)-specific demethylase 1A
10475845	3,243953186	0,046687791	Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase-like
10450694	3,237746424	0	H2-T22	histocompatibility 2, T region locus 22
10504838	3,22772127	2,22E-10	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
10445774	3,219357963	0	B430306N03Rik	RIKEN cDNA B430306N03 gene
10347948	3,21304013	0	Sp100	nuclear antigen Sp100
10382846	3,20879139	1,01E-10	BC018473	cDNA sequence BC018473
10445909	3,186293137	7,95E-10	Kat2b	K(lysine) acetyltransferase 2B
10450723	3,181144707	1,19E-11	H2-T10	histocompatibility 2, T region locus 10
10547657	3,179304063	0	C3ar1	complement component 3a receptor 1

10448235	3,176790606	0,000978234	A630033E08Rik	RIKEN cDNA A630033E08 gene
10397633	3,167672093	1,10E-10	Flrt2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
10439268	3,161499519	0	Dtx3l	deltex 3-like (Drosophila)
10474201	3,160272582	3,26E-11	Lmo2	LIM domain only 2
10395466	3,137455507	1,20E-09	Dock4	dedicator of cytokinesis 4
10345445	3,135020768	0,000443839	Arid5a	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)
10378637	3,134201642	9,36E-08	Scarf1	scavenger receptor class F, member 1
10385526	3,088435069	0	9930111J21Rik2	RIKEN cDNA 9930111J21 gene 2
10414514	3,087908492	0	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase
10485378	3,083972712	1,81E-05	Prr5l	proline rich 5 like
10531737	3,074724183	7,33E-10	Hpse	heparanase
10554549	3,073628923	8,04E-10	Whamm	WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules
10435457	3,073173035	0	Parp9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9
10530467	3,072998366	0,001073846	Nfx1l	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1
10376513	3,06172562	2,97E-12	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3
10374793	3,059671994	7,71E-11	Pnpt1	polynucleotide nucleotidyltransferase 1
10415293	3,056365329	1,22E-10	Rnf31	ring finger protein 31
10397351	3,038754237	0,000258448	Jdp2	Jun dimerization protein 2
10414527	3,029017682	0	Pnp2	purine-nucleoside phosphorylase 2
10486396	3,018213789	2,08E-11	Ehd4	EH-domain containing 4
10410641	3,012814816	0,002156428	Lrrc14b	leucine rich repeat containing 14B
10384555	3,005385381	0	Aftph	afthophilin
10535739	3,002763809	1,61E-09	Usp12	ubiquitin specific peptidase 12
10514275	2,99288947	1,51E-09	Ptplad2	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2
10577882	2,990030084	1,24E-09	Hgsnat	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
10487823	2,987939631	3,32E-10	Siglec1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
10376060	2,964101806	0	Irf1	interferon regulatory factor 1
10412562	2,959810887	2,21E-05	Flnb	filamin, beta
10498367	2,95940265	2,16E-10	P2ry13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13
10597279	2,941463226	0	Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2
10401160	2,931178852	8,81E-10	Tmem229b	transmembrane protein 229B
10502050	2,916034928	3,13E-08	Alpk1	alpha-kinase 1
10496592	2,912705824	0	Gbp2	guanylate binding protein 2
10504672	2,904190319	5,13E-10	Tdrd7	tudor domain containing 7
10581378	2,889800704	0	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10
10551355	2,888162667	2,94E-08	Sertad3	SERTA domain containing 3
10513722	2,886633604	0	Tnfsf15	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
10385325	2,882914399	5,63E-11	Pttg1	pituitary tumor-transforming gene 1
10461093	2,865533972	3,32E-09	Pla2g16	phospholipase A2, group XVI
10533304	2,862675218	0	Trafd1	TRAF type zinc finger domain containing 1
10519060	2,854893643	8,29E-08	Tnfrsf14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
10376455	2,849686077	1,17E-09	Hist3h2a	histone cluster 3, H2a
10387985	2,844685182	0	A430084P05Rik	RIKEN cDNA A430084P05 gene
10346191	2,84331315	0	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
10434291	2,839885965	0,013448919	B3gnt5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
10398907	2,830513883	5,93E-12	Pld4	phospholipase D family, member 4
10362129	2,829540917	1,35E-07	Vnn3	vanin 3

10429560	2,827390202	6,17E-10	Ly6i	lymphocyte antigen 6 complex, locus I
10382106	2,819227691	1,30E-10	Gm885	predicted gene 885
10439249	2,813314811	0	Parp14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
10445033	2,80805657	2,20E-07	Trim26	tripartite motif-containing 26
10445442	2,784198361	2,44E-07	Gtpbp2	GTP binding protein 2
10348666	2,769911726	2,45E-06	Dusp28	dual specificity phosphatase 28
10407145	2,764895587	2,40E-07	Mier3	mesoderm induction early response 1, family member 3
10452980	2,763646325	6,82E-11	Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
10354054	2,741850671	1,98E-08	Mitd1	MIT, microtubule interacting and transport, domain containing 1
10360382	2,731334484	0	Ifi204	interferon activated gene 204
10548552	2,727183923	8,95E-07	Klra2	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 2
10535979	2,725205456	1,64E-07	Rfc3	replication factor C (activator 1) 3
10462113	2,718283636	0,019089577	Apba1	amyloid beta (A4) precursor protein binding, family A, member 1
10597758	2,717221171	8,42E-07	Csrnp1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1
10573490	2,705315773	0,001119457	Hook2	hook homolog 2 (Drosophila)
10425024	2,694461551	1,76E-07	1110038F14Rik	RIKEN cDNA 1110038F14 gene
10547976	2,682172453	6,44E-08	Tapbp1	TAP binding protein-like
10511498	2,681735591	1,79E-08	Plekhf2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
10363163	2,681534844	1,27E-07	Asf1a	ASF1 anti-silencing function 1 homolog A (S, cerevisiae)
10505791	2,678466032	0,010762073	BC057079	cDNA sequence BC057079
10525271	2,676929232	7,54E-07	Naa25	N(alpha)-acetyltransferase 25, NatB auxiliary subunit
10434778	2,675923737	0	Rtp4	receptor transporter protein 4
10505187	2,665274268	7,23E-07	Ugcg	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
10381872	2,647746495	2,16E-07	Tlk2	tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)
10587942	2,640593086	7,51E-07	Xrn1	5'-3' exoribonuclease 1
10447629	2,635929893	1,71E-06	Tagap1	T-cell activation GTPase activating protein 1
10472097	2,625827239	1,09E-07	Fmnl2	formin-like 2
10368947	2,624586234	2,09E-07	Aim1	absent in melanoma 1
10410435	2,62062332	3,47E-07	Papd7	PAP associated domain containing 7
10476301	2,619070691	1,21E-06	Smox	spermine oxidase
10474700	2,615349948	2,47E-06	Thbs1	thrombospondin 1
10429568	2,60490363	2,28E-08	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1
10467136	2,602449196	0	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase
10446229	2,601051564	1,54E-05	Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
10445867	2,593562255	1,36E-06	Plcl2	phospholipase C-like 2
10492689	2,591698689	4,25E-05	Pdgfc	platelet-derived growth factor, C polypeptide
10587495	2,587805163	2,29E-06	Irak1bp1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1
10482509	2,582372285	6,33E-07	Rbm43	RNA binding motif protein 43
10351792	2,579164872	5,03E-08	Slamf9	SLAM family member 9
10437236	2,576688253	1,29E-07	B230307C23Rik	RIKEN cDNA B230307C23 gene
10548105	2,574369252	2,97E-12	Ccnd2	cyclin D2
10361669	2,573837551	1,42E-10	Katna1	katanin p60 (ATPase-containing) subunit A1
10495574	2,569958388	2,19E-05	Sass6	spindle assembly 6 homolog (C, elegans)
10462140	2,566906951	8,81E-07	Dock8	dedicator of cytokinesis 8
10388902	2,564575421	0	Lgals9	lectin, galactose binding, soluble 9
10465853	2,561757652	2,37E-10	Stxbp3a	syntaxin binding protein 3A
10496569	2,558751424	0	Gbp6	guanylate binding protein 6

10450145	2,558254866	0	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
10544629	2,556661214	1,61E-07	Tra2a	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)
10535477	2,543207189	1,67E-05	Usp42	ubiquitin specific peptidase 42
10379721	2,529355813	0	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
10566578	2,527126705	3,88E-07	Gm8979	very large inducible GTPase 1 pseudogene
10526459	2,514634987	1,15E-06	Rasa4	RAS p21 protein activator 4
10542885	2,511226224	1,05E-07	2810474O19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene
10367973	2,507757767	0,000371999	Aig1	androgen-induced 1
10521709	2,506980892	3,90E-07	Lap3	leucine aminopeptidase 3
10490159	2,496365191	0,000181899	Pmepa1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1
10490923	2,492417929	2,67E-05	Car2	carbonic anhydrase 2
10407392	2,488642503	2,13E-05	BC016423	cDNA sequence BC016423
10444068	2,482545225	0	Tapbp	TAP binding protein
10360506	2,476490351	7,21E-08	Akt3	thymoma viral proto-oncogene 3
10425321	2,472212918	2,37E-07	Apobec3	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 3
10367919	2,468045514	7,24E-05	Stx11	syntaxin 11
10372583	2,46254997	5,75E-05	Rab3ip	RAB3A interacting protein
10582985	2,461179703	8,30E-11	Casp1	caspace 1
10593646	2,458223346	1,83E-06	Tnfaip8l3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3
10381154	2,45791155	0,000100303	Cnp	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
10537227	2,457621939	1,02E-07	Tmem140	transmembrane protein 140
10508074	2,456300383	0,000163932	Csf3r	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
10543512	2,45445208	3,19E-06	Zfp800	zinc finger protein 800
10466932	2,450632242	1,36E-06	Insl6	insulin-like 6
10374068	2,450260266	1,24E-08	Dbnl	drebrin-like
10502165	2,447775083	2,04E-08	Sec24b	Sec24 related gene family, member B (S, cerevisiae)
10542872	2,440375243	0,000811365	Rps4y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2
10584841	2,437933882	0,011814232	Amica1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1
10600698	2,436915117	0,000151937	5430427O19Rik	RIKEN cDNA 5430427O19 gene
10497358	2,432719529	3,32E-08	Sirpb1b	signal-regulatory protein beta 1B
10380871	2,428039682	1,12E-06	Stard3	START domain containing 3
10496605	2,422918706	0,019596629	Ccb12	cysteine conjugate-beta lyase 2
10409804	2,420868978	4,45E-06	Zcchc6	zinc finger, CCHC domain containing 6
10421488	2,414301747	2,94E-10	Fndc3a	fibronectin type III domain containing 3A
10592790	2,405987255	0,000481293	Hinfp	histone H4 transcription factor
10515012	2,404393458	9,39E-06	Prpf38a	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing A
10421950	2,399285767	0,00046909	Dach1	dachshund 1 (Drosophila)
10455472	2,391951272	3,77E-06	Dcp2	DCP2 decapping enzyme homolog (S, cerevisiae)
10555862	2,385060727	8,79E-05	Trim34	tripartite motif-containing 34
10493565	2,382458361	3,10E-05	Adar	adenosine deaminase, RNA-specific
10416044	2,373947451	1,06E-05	Ccdc25	coiled-coil domain containing 25
10389451	2,373103462	1,17E-07	Med13	mediator complex subunit 13
10538338	2,371597202	5,16E-07	Creb5	cAMP responsive element binding protein 5
10374333	2,368114766	7,51E-06	Ikzf1	IKAROS family zinc finger 1
10527936	2,366175364	0,001131638	Fzd1	frizzled homolog 1 (Drosophila)
10481711	2,357168676	8,60E-05	Stxbp1	syntaxin binding protein 1
10482500	2,353516553	9,41E-06	Rnd3	Rho family GTPase 3
10421697	2,348660197	1,37E-05	9030625A04Rik	RIKEN cDNA 9030625A04 gene
10471486	2,34766572	0,000658889	Eng	endoglin

10360391	2,346515516	0	Ifi203	interferon activated gene 203
10566583	2,345214692	1,04E-10	Gm8995	predicted gene 8995
10394971	2,344325669	0,003478605	Klf11	Kruppel-like factor 11
10450682	2,342410621	2,06E-05	H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23
10566358	2,338948344	0	Trim30a	tripartite motif-containing 30A
10523563	2,331247212	0,001947688	Cds1	CDP-diacylglycerol synthase 1
10375331	2,329040941	2,88E-06	Il12b	interleukin 12b
10375343	2,327175479	0,000136844	Rnf145	ring finger protein 145
10589982	2,324344642	0,000200852	Azi2	5-azacytidine induced gene 2
10371502	2,320531047	2,71E-07	Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
10483604	2,305628382	4,30E-05	Slc25a12	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar), member 12
10599893	2,301417936	0,000253498	Fmr1	fragile X mental retardation syndrome 1 homolog
10391301	2,298938703	1,92E-05	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
10523766	2,296667491	3,94E-07	Lrrc8c	leucine rich repeat containing 8 family, member C
10525195	2,2828673	0,002075612	Gm15800	predicted gene 15800
10394749	2,282217041	0,005397173	Nol10	nucleolar protein 10
10419854	2,281353481	7,39E-08	Slc7a8	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8
10486172	2,280022403	0,000850954	Fam82a2	family with sequence similarity 82, member A2
10428912	2,276071691	0,002069498	Fam84b	family with sequence similarity 84, member B
10379646	2,276027517	0,000346873	Slfn3	schlafen 3
10414374	2,267610729	0,000220877	Ktn1	kinectin 1
10542911	2,262566193	2,97E-12	Samd9l	sterile alpha motif domain containing 9-like
10359181	2,261645793	3,72E-08	Tor3a	torsin family 3, member A
10504450	2,261300936	0,000176652	Glipr2	GLI pathogenesis-related 2
10349081	2,260012888	0,000511471	Phlpp1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
10369877	2,259779489	1,23E-07	Ube2d1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1, UBC4/5 homolog (yeast)
10491621	2,257590778	0,00241495	4932438A13Rik	RIKEN cDNA 4932438A13 gene
10438738	2,246811356	0,001000359	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6
10450920	2,233660619	0	AY036118	cDNA sequence AY036118
10389151	2,233573918	0,000971211	Slfn10-ps	schlafen 10, pseudogene
10596960	2,233386594	9,28E-05	Trex1	three prime repair exonuclease 1
10376885	2,233176067	0,001511484	Snord49b	small nucleolar RNA, C/D box 49B
10407985	2,232659122	3,22E-07	Gpr141	G protein-coupled receptor 141
10405619	2,231664262	4,45E-05	5133401N09Rik	RIKEN cDNA 5133401N09 gene
10522024	2,230595629	0,002390952	Tbc1d1	TBC1 domain family, member 1
10533720	2,227519405	0,000135756	Niacr1	niacin receptor 1
10369102	2,223377624	0,006659667	Gm9766	predicted gene 9766
10359097	2,221644531	4,86E-06	Tor1aip1	torsin A interacting protein 1
10463112	2,217696591	0,005981662	Ccnj	cyclin J
10404840	2,211620731	0,000475853	Cd83	CD83 antigen
10445953	2,21058468	0,003554512	Emr4	EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 4
10526961	2,206329097	0,00585955	Mafk	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)
10482802	2,205067776	0,000288552	Cytip	cytohesin 1 interacting protein
10584572	2,204757525	1,59E-09	Hspa8	heat shock protein 8
10404702	2,202922895	0,027643683	Gcnt2	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme
10389207	2,198150247	0	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5
10541555	2,197767846	0,014424066	Clec4a1	C-type lectin domain family 4, member a1

10508392	2,196372876	2,40E-05	Rnf19b	ring finger protein 19B
10470936	2,196365264	0,000137848	Tbc1d13	TBC1 domain family, member 13
10571705	2,195006177	2,48E-06	Irf2	interferon regulatory factor 2
10415662	2,183791319	0,006751459	Rcbtb1	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 1
10462390	2,182194961	0	Cd274	CD274 antigen
10409376	2,181567329	0,001732041	Hk3	hexokinase 3
10602625	2,180698018	0,013354259	Iqsec2	IQ motif and Sec7 domain 2
10412345	2,176845474	0,000273298	Parp8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8
10559610	2,170174422	0,000328229	Ppp6r1	protein phosphatase 6, regulatory subunit 1
10396278	2,169926235	0,000548697	Daam1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1
10606355	2,168446726	0,015400308	Cysltr1	cysteinyl leukotriene receptor 1
10586505	2,157714521	0,009661356	Herc1	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1
10404874	2,153554747	0,006278138	Mylip	myosin regulatory light chain interacting protein
10357788	2,152293759	0,016301841	Ppp1r15b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b
10537428	2,149005239	0,013435703	Rab19	RAB19, member RAS oncogene family
10358757	2,143379037	0,005402331	Smg7	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C, elegans)
10384782	2,142138856	0,00823822	Vrk2	vaccinia related kinase 2
10352234	2,137127528	0,006135212	Itpkb	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
10497349	2,13593834	1,26E-05	Sirpb1a	signal-regulatory protein beta 1A
10509645	2,125947544	0,002773008	Ubr4	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 4
10363007	2,12468063	0,0009132	Ascc3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
10436561	2,123233443	8,13E-07	Usp25	ubiquitin specific peptidase 25
10429573	2,115245331	0,004840231	Ly6c2	lymphocyte antigen 6 complex, locus C2
10585048	2,115119243	0,005014013	Cadm1	cell adhesion molecule 1
10458028	2,113740104	0,02456137	Gypc	glycophorin C
10421258	2,112673756	0,042784082	Pdlim2	PDZ and LIM domain 2
10458340	2,10514995	0,010116912	Hbegf	heparin-binding EGF-like growth factor
10353524	2,103539633	0,01514461	Ogfrl1	opioid growth factor receptor-like 1
10580191	2,100619704	0,023036573	Nfix	nuclear factor IX
10424119	2,099599268	3,15E-05	Nov	nephroblastoma overexpressed gene
10488060	2,098698612	0,006795236	Jag1	jagged 1
10489107	2,097716914	0	Samhd1	SAM domain and HD domain, 1
10565712	2,093016957	0,026116088	Acer3	alkaline ceramidase 3
10452978	2,091774017	0,03214595	Gm6548	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 pseudogene
10469278	2,087101842	0,022464872	Il2ra	interleukin 2 receptor, alpha chain
10372668	2,084690193	3,38E-05	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2
10524150	2,079801728	0,008856102	Ankle2	ankyrin repeat and LEM domain containing 2
10366346	2,075652598	0,001477491	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
10571007	2,072259964	0,031148173	Whsc111	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human)
10479087	2,072110586	0,015335267	Stx16	syntaxin 16
10483770	2,069515423	0,031204825	Lnp	limb and neural patterns
10350349	2,065969563	0,010624232	Dennd1b	DENN/MADD domain containing 1B
10496555	2,062494111	3,00E-10	Gbp1	guanylate binding protein 1
10475525	2,062138168	0,023268468	Pldn	pallidin
10374236	2,060193719	8,96E-06	Upp1	uridine phosphorylase 1
10542156	2,055631977	4,32E-05	Clec2d	C-type lectin domain family 2, member d
10581222	2,055569285	0,042119494	Fhod1	formin homology 2 domain containing 1
10378126	2,053863068	0,006389095	Ankfy1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1

10444258	2,051676115	2,67E-05	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
10595990	2,051326305	0,010813762	Armc8	armadillo repeat containing 8
10412624	2,050747685	0,035067994	Pxk	PX domain containing serine/threonine kinase
10502071	2,050720677	0,017882908	5730508B09Rik	RIKEN cDNA 5730508B09 gene
10460582	2,049194607	0,006645215	AI837181	expressed sequence AI837181
10364030	2,047815869	0,029987099	Adora2a	adenosine A2a receptor
10421581	2,0454723	0,009752704	Lrch1	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 1
10547621	2,044414884	0,002582876	Apobec1	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1
10353028	2,032024786	0,003403105	Vcpip1	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1
10405125	2,031713533	0,02066098	Fbxw17	F-box and WD-40 domain protein 17
10424335	2,031141854	0,027659626	Rnf139	ring finger protein 139
10413419	2,020799238	0,002289229	Arhgef3	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3
10469046	2,017369009	0,016755165	Phyh	phytanoyl-CoA hydroxylase
10347931	2,016774805	0	G530012D18Rik	RIKEN cDNA G530012D1 gene
10523955	2,0155492	0,000913232	Dr1	down-regulator of transcription 1
10587534	2,013437933	0,023248448	Bckdhb	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide
10407126	2,008209804	2,26E-07	Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila)
10376312	2,00167257	0,005713084	Larp1	La ribonucleoprotein domain family, member 1
Probe Set ID	Fold Change F6 vs W6	Bonf F6 vs W6	Gene Symbol	Gene Description
10360398	-14,89874598	2,64E-20	Ifi202b	interferon activated gene 202B
10424349	-9,704991841	1,78E-40	Sqle	squalene epoxidase
10541581	-8,382171271	5,42E-24	Clec4b1	C-type lectin domain family 4, member b1
10463355	-7,595015979	2,67E-32	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2
10357261	-6,926175769	1,82E-29	Marco	macrophage receptor with collagenous structure
10445141	-6,571669834	2,42E-13	Olf111	olfactory receptor 111
10563883	-6,501546826	2,93E-08	Depdc1a	DEP domain containing 1a
10506571	-5,807857274	2,35E-25	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase
10594251	-5,806287463	3,16E-14	Kif23	kinesin family member 23
10350146	-5,711176616	6,70E-20	Phlda3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3
10501046	-5,698060738	2,04E-09	Gm10673	predicted gene 10673
10591781	-5,653514516	1,77E-07	Anln	anillin, actin binding protein
10497831	-5,648445969	6,41E-21	Ccna2	cyclin A2
10347748	-5,404739185	1,64E-08	Acsl3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
10433887	-5,281797534	1,15E-12	Pkp2	plakophilin 2
10490294	-5,231958147	2,27E-18	Gm14326	predicted gene 14326
10474769	-5,089927123	1,45E-10	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S, cerevisiae)
10562117	-4,937302366	1,24E-14	Ffar2	free fatty acid receptor 2
10407792	-4,880185544	3,69E-23	Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene
10555235	-4,849479804	1,54E-16	Arrb1	arrestin, beta 1
10385248	-4,842744872	4,59E-06	Hmnr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
10465990	-4,835791357	7,87E-14	Tmem216	transmembrane protein 216
10420730	-4,827007271	3,01E-23	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
10345762	-4,779918435	2,78E-16	Il1r1	interleukin 1 receptor, type 1
10562637	-4,729756789	5,26E-16	Ccnb1	cyclin B1
10392796	-4,629745854	1,33E-10	Cd300lb	CD300 antigen like family member B
10578916	-4,60165875	1,82E-21	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like
10557156	-4,583640829	8,26E-11	Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)



10540897	-4,478814764	1,28E-14	Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma
10399908	-4,426176556	4,37E-18	Prkar2b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta
10582310	-4,369729575	7,50E-14	Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase
10382321	-4,362741518	0,000176546	Kcnj2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
10594774	-4,33039912	1,24E-13	Ccnb2	cyclin B2
10364194	-4,328676542	2,64E-06	Lss	lanosterol synthase
10600852	-4,309821146	3,27E-06	F630028O10Rik	RIKEN cDNA F630028O10 gene
10359917	-4,243865694	2,57E-13	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
10499483	-4,177457063	2,24E-13	Fdps	farnesyl diphosphate synthetase
10501048	-4,133145064	5,36E-06	Dennd2d	DENN/MADD domain containing 2D
10487480	-4,066785785	5,88E-10	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S, cerevisiae)
10596454	-4,062142922	1,55E-31	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1
10490232	-4,046562841	3,13E-12	Gm14403	predicted gene 14403
10592585	-4,046240295	3,93E-12	Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S, cerevisiae)
10510254	-4,030522847	0,001032184	Fv1	Friend virus susceptibility 1
10509122	-3,97394526	0,000466816	Cnr2	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
10483401	-3,925779111	1,11E-06	Spc25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S, cerevisiae)
10472514	-3,90750576	1,85E-11	Nostrin	nitric oxide synthase trafficker
10389606	-3,858443553	2,25E-10	Prr11	proline rich 11
10408666	-3,812980096	0,007894374	Rpp40	ribonuclease P 40 subunit (human)
10383532	-3,787271899	8,66E-11	Narf	nuclear prelamin A recognition factor
10565958	-3,78128083	1,30E-11	P2ry6	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
10463121	-3,755770738	0,002390431	Zfp518a	zinc finger protein 518A
10463476	-3,74481643	1,80E-10	Kazald1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
10432032	-3,738325004	0,00020196	Vdr	vitamin D receptor
10458033	-3,734867339	1,71E-10	Stard4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
10399478	-3,720712713	2,36E-06	Lpin1	lipin 1
10351477	-3,6996095	3,60E-10	Sh2d1b1	SH2 domain protein 1B1
10527920	-3,629835076	8,16E-11	Cyp51	cytochrome P450, family 51
10418766	-3,619037357	7,63E-10	Ankrd28	ankyrin repeat domain 28
10462796	-3,602076947	1,82E-07	Kif11	kinesin family member 11
10493555	-3,600679027	9,53E-10	Kcnn3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
10461408	-3,59937396	1,01E-09	Rab3il1	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1
10429128	-3,595496487	4,00E-23	Sla	src-like adaptor
10561907	-3,55839829	1,70E-09	Sdhaf1	succinate dehydrogenase complex assembly factor 1
10454709	-3,544089409	5,75E-06	Kif20a	kinesin family member 20A
10378649	-3,52722596	2,54E-09	Slc43a2	solute carrier family 43, member 2
10427918	-3,524474091	3,58E-09	Fam105a	family with sequence similarity 105, member A
10467979	-3,52055773	3,22E-09	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1
10528484	-3,505594194	1,68E-08	Srpk2	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
10459288	-3,504049123	4,42E-09	Adrb2	adrenergic receptor, beta 2
10412466	-3,475361375	2,08E-10	Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
10550877	-3,469769917	4,77E-10	Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
10541729	-3,462989468	7,39E-09	Cdca3	cell division cycle associated 3
10469312	-3,422928128	0,002456342	Pter	phosphotriesterase related
10515431	-3,409246701	0,001931161	Kif2c	kinesin family member 2C
10432511	-3,39523398	4,75E-05	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1
10516246	-3,392373455	2,21E-08	Cdca8	cell division cycle associated 8
10413928	-3,39084773	1,95E-08	1810011H11Rik	RIKEN cDNA 1810011H11 gene
10438585	-3,387537694	1,54E-08	Tmem41a	transmembrane protein 41a
10418480	-3,386047003	2,14E-08	Gnl3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)

10445139	-3,369496436	0,028272984	Olf110	olfactory receptor 110
10430931	-3,339029871	2,02E-11	Nfam1	Nfat activating molecule with ITAM motif 1
10465895	-3,315698898	5,11E-05	Fads2	fatty acid desaturase 2
10479217	-3,306151876	1,95E-05	Gm14420	predicted gene 14420
10409338	-3,305388845	3,22E-08	Nop16	NOP16 nucleolar protein homolog (yeast)
10365286	-3,298335147	2,77E-06	Eid3	EP300 interacting inhibitor of differentiation 3
10601993	-3,296851717	5,13E-08	D330045A20Rik	RIKEN cDNA D330045A20 gene
10520521	-3,280662083	6,86E-08	Cenpa	centromere protein A
10382998	-3,278066223	1,07E-07	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5
10584604	-3,265769572	8,30E-07	Trim29	tripartite motif-containing 29
10430660	-3,260992222	5,01E-06	Pdgfb	platelet derived growth factor, B polypeptide
10561837	-3,258956285	1,73E-05	Zfp146	zinc finger protein 146
10359890	-3,257314452	2,88E-05	Nuf2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S, cerevisiae)
10360985	-3,253722019	0,010470364	Cenpf	centromere protein F
10374453	-3,250097504	5,01E-10	Glul	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)
10479228	-3,245547791	1,34E-07	Etohi1	ethanol induced 1
10600988	-3,223024153	1,31E-07	Awat1	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1
10362811	-3,205019201	5,93E-06	Sesn1	sestrin 1
10592772	-3,19854327	7,18E-06	Abcg4	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4
10389581	-3,188780958	2,89E-07	Ypel2	yippee-like 2 (Drosophila)
10461158	-3,186589099	3,58E-05	Snhg1	small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 1
10601011	-3,165156862	0,005903587	Kif4	kinesin family member 4
10455752	-3,156375836	4,27E-07	Snx24	sorting nexin 24
10497265	-3,131997367	7,11E-07	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
10361065	-3,119249598	8,28E-07	Mfsd7b	major facilitator superfamily domain containing 7B
10453049	-3,108227279	4,50E-07	Cdc42ep3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
10421269	-3,089743338	8,07E-07	Sorbs3	sorbin and SH3 domain containing 3
10382912	-3,064770406	3,58E-15	sept-09	septin 9
10595614	-3,045309797	2,18E-06	2810026P18Rik	RIKEN cDNA 2810026P18 gene
10504817	-3,041394583	1,30E-13	Tgfr1	transforming growth factor, beta receptor I
10451395	-3,033320624	1,98E-06	Klc4	kinesin light chain 4
10348432	-3,017061281	4,22E-10	Agap1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1
10350594	-3,00780909	1,53E-07	Ivns1abp	influenza virus NS1A binding protein
10466000	-2,996817024	2,77E-06	Tmem138	transmembrane protein 138
10605034	-2,996104617	1,27E-05	Xlr4c	X-linked lymphocyte-regulated 4C
10461439	-2,989634257	2,86E-06	Fads1	fatty acid desaturase 1
10445729	-2,986194219	1,47E-05	Tcf7	transcription factor EB
10584710	-2,981443506	3,49E-06	H2afx	H2A histone family, member X
10585186	-2,97807482	5,81E-25	1600029D21Rik	RIKEN cDNA 1600029D21 gene
10381708	-2,967594558	5,55E-06	Fmn1	formin-like 1
10582811	-2,942142247	6,59E-06	Irf2bp2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2
10538373	-2,94060295	0,001617904	Prr15	proline rich 15
10550098	-2,935529999	7,02E-06	Wdr12	WD repeat domain 12
10351037	-2,930228153	6,07E-06	Gas5	growth arrest specific 5
10378319	-2,928492095	3,91E-05	P2rx5	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5
10390560	-2,922343973	8,55E-06	Stac2	SH3 and cysteine rich domain 2
10371662	-2,914054784	1,57E-05	Sp1	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
10400006	-2,912065892	7,64E-06	Ahr	aryl-hydrocarbon receptor
10505438	-2,907030081	1,90E-07	Orm1	orosomucoid 1
10568221	-2,904989603	4,32E-06	Seps2	selenophosphate synthetase 2
10490250	-2,894644144	2,11E-11	Gm14391	predicted gene 14391
10369453	-2,885937388	0,000771505	X99384	cDNA sequence X99384
10471844	-2,883549923	1,03E-10	Nek6	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 6

10580469	-2,87856941	2,48E-05	Cbln1	cerebellin 1 precursor protein
10481210	-2,876877916	5,93E-05	Vav2	vav 2 oncogene
10346365	-2,871970639	0,011935435	Sgol2	shugoshin-like 2 (S, pombe)
10360580	-2,871065014	1,34E-05	Tfb2m	transcription factor B2, mitochondrial
10478572	-2,868735587	2,18E-05	Ube2c	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
10510391	-2,868574526	1,82E-05	Srm	spermidine synthase
10361760	-2,866962432	8,11E-06	Timm8a1	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a1 (yeast)
10581538	-2,866565014	2,24E-05	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
10432640	-2,865984883	1,41E-05	Bin2	bridging integrator 2
10515090	-2,86209389	0,019462259	Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
10361375	-2,856855368	9,47E-05	Fbxo5	F-box protein 5
10431872	-2,828062492	2,60E-05	Slc38a1	solute carrier family 38, member 1
10436978	-2,815402129	3,66E-05	Cbr3	carbonyl reductase 3
10405074	-2,802104967	4,01E-05	Nol8	nucleolar protein 8
10491860	-2,786208069	6,79E-05	Phf17	PHD finger protein 17
10462632	-2,785277361	0,004615251	Kif20b	kinesin family member 20B
10604630	-2,784034328	2,28E-07	Mospd1	motile sperm domain containing 1
10355534	-2,78395135	5,99E-05	Tns1	tensin 1
10390707	-2,781343634	2,83E-05	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha
10535894	-2,780110064	0,000299909	Hmgb1	high mobility group box 1
10599696	-2,777140178	0,035686649	Ddx26b	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B
10589087	-2,776805254	0,000843213	Prkar2a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha
10348062	-2,775369773	5,77E-05	B3gnt7	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 7
10498584	-2,769381869	0,003429683	Rarres1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
10583326	-2,761928554	2,35E-06	Slc36a4	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4
10581547	-2,742787781	0,000105898	Nob1	NIN1/RPN12 binding protein 1 homolog (S, cerevisiae)
10441787	-2,741900085	0,001764993	Airn	antisense Igf2r RNA
10466712	-2,741242577	1,79E-06	Mamdc2	MAM domain containing 2
10388241	-2,741119074	5,10E-05	Ctns	cystinosis, nephropathic
10513869	-2,7292849	0,002661467	Megf9	multiple EGF-like-domains 9
10498620	-2,728170859	0,026275188	Trim59	tripartite motif-containing 59
10357043	-2,726144435	0,001001781	Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
10409990	-2,723534231	0,000115267	6720489N17Rik	RIKEN cDNA 6720489N17 gene
10590383	-2,712281651	2,07E-08	Deb1	differentially expressed in B16F10 1
10540472	-2,707724579	4,22E-10	Bhlhe40	basic helix-loop-helix family, member e40
10389842	-2,70365862	1,00E-05	Utp18	UTP18, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)
10375083	-2,702416422	0,000185037	Stk10	serine/threonine kinase 10
10574087	-2,702339623	4,07E-08	Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
10527009	-2,698102207	0,000128827	Chst12	carbohydrate sulfotransferase 12
10479749	-2,696150443	0,013836035	Rpp38	ribonuclease P/MRP 38 subunit (human)
10449191	-2,69196938	0,000185009	Solh	small optic lobes homolog (Drosophila)
10490259	-2,689278188	5,87E-06	100043387	predicted gene, 100043387
10490291	-2,689278188	5,87E-06	0610010B08Rik	RIKEN cDNA 0610010B08 gene
10490262	-2,689278188	5,87E-06	Gm14430	predicted gene 14430
10423894	-2,689032142	3,12E-08	Tm7sf4	transmembrane 7 superfamily member 4
10539702	-2,683312349	0,000203055	Fam136a	family with sequence similarity 136, member A
10448214	-2,664018313	0,008520874	6330416L07Rik	RIKEN cDNA 6330416L07 gene
10354207	-2,663822586	0,000661019	Creg2	cellular repressor of E1A-stimulated genes 2
10349239	-2,659501775	0,000318201	Mki67ip	Mki67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein
10413897	-2,658578379	0,002080577	Ercc6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6

10546272	-2,655118038	8,17E-09	Iqsec1	IQ motif and Sec7 domain 1
10572290	-2,642755578	0,000413857	Nr2c2ap	nuclear receptor 2C2-associated protein
10552140	-2,633928166	1,68E-06	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
10402787	-2,633694487	3,37E-09	Ahnak2	AHNAK nucleoprotein 2
10543120	-2,629681364	0,000458007	Ica1	islet cell autoantigen 1
10530806	-2,628085114	0,000450607	Ppat	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase
10579468	-2,627739023	0,000883747	Haus8	4HAUS augmin-like complex, subunit 8
10554445	-2,624880965	0,000399518	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1
10490104	-2,624222415	0,000945479	Aurka	aurora kinase A
10512791	-2,613231617	0,000392135	Tbc1d2	TBC1 domain family, member 2
10550332	-2,612183054	3,22E-05	Slc1a5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5
10436106	-2,607123635	0,021990992	C330027C09Rik	RIKEN cDNA C330027C09 gene
10506880	-2,603560623	0,000424072	Kti12	KTI12 homolog, chromatin associated (S, cerevisiae)
10582626	-2,597824553	0,008229833	Abcb10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10
10472893	-2,597309611	0,002183369	B230120H23Rik	RIKEN cDNA B230120H23 gene
10417972	-2,5942239	0,000491788	Camk2g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
10400883	-2,591210106	0,000509318	Timm9	translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog (yeast)
10590549	-2,589019803	0,000554974	Exosc7	exosome component 7
10441456	-2,585386552	0,003773248	Synj2	synaptojanin 2
10428827	-2,584752243	0,000679598	Tmem65	transmembrane protein 65
10590586	-2,583818981	0,000679019	Limd1	LIM domains containing 1
10431266	-2,583020333	0,000624116	Cerk	ceramide kinase
10386628	-2,579172023	0,000888784	Gm16515	predicted gene, Gm16515
10596303	-2,57905761	0,00015051	Acpp	acid phosphatase, prostate
10390519	-2,570539177	0,00166489	Plxdc1	plexin domain containing 1
10358879	-2,5660744	0,00084688	Npl	N-acetylneuraminate pyruvate lyase
10474875	-2,562794856	0,011479029	Casc5	cancer susceptibility candidate 5
10583920	-2,561466458	0,000741456	Eepd1	endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain containing 1
10600131	-2,55891992	0,001417954	Xlr4b	X-linked lymphocyte-regulated 4B
10492682	-2,553623795	0,001928859	Fam198b	family with sequence similarity 198, member B
10465916	-2,546218099	0,001304031	Gm98	predicted gene 98
10503643	-2,54557399	0,000891804	Ndufaf4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 4
10419073	-2,54169338	0,001392847	Tspan14	tetraspanin 14
10521731	-2,534327553	0,017814457	Ncapg	non-SMC condensin I complex, subunit G
10492815	-2,532822541	1,21E-07	Tmem154	transmembrane protein 154
10512022	-2,532673318	1,57E-05	Mobkl2b	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)
10395058	-2,532508305	4,59E-05	Adi1	acireductone dioxygenase 1
10586168	-2,525853561	0,033207546	Snord16a	small nucleolar RNA, C/D box 16A
10495763	-2,525228607	2,19E-08	Gclm	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
10421810	-2,523634537	0,000380997	1190002H23Rik	RIKEN cDNA 1190002H23 gene
10444066	-2,523127306	0,001819993	Zbtb22	zinc finger and BTB domain containing 22
10579799	-2,521824712	0,001821817	Tmem184c	transmembrane protein 184C
10567825	-2,521478633	0,000116717	Lat	linker for activation of T cells
10589329	-2,519748948	0,029045616	Pfkfb4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
10477061	-2,519490471	4,84E-08	Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S, cerevisiae)
10454039	-2,518917724	6,53E-07	Impact	imprinted and ancient
10355806	-2,517952382	2,82E-07	Tuba4a	tubulin, alpha 4A
10438313	-2,516287905	0,001300989	Dgcr8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
10481453	-2,510872897	0,001927527	Dolk	dolichol kinase
10518019	-2,506958302	0,000935617	Ddi2	DNA-damage inducible protein 2
10571399	-2,505278517	0,002191992	Zdhhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2

10352725	-2,495704285	0,000368687	Tmem206	transmembrane protein 206
10573865	-2,495247636	0,002553419	Gm3579	predicted gene 3579
10378508	-2,487440471	0,001948582	Tsr1	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (yeast)
10382104	-2,476263774	0,003253736	Snord104	small nucleolar RNA, C/D box 104
10354868	-2,471023961	0,002322276	Fam126b	family with sequence similarity 126, member B
10394978	-2,465731997	0,003533387	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
10596053	-2,465679015	0,00334357	Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
10379176	-2,461752972	5,11E-05	Unc119	unc-119 homolog (C, elegans)
10447341	-2,461590874	3,05E-06	Rhoq	ras homolog gene family, member Q
10548761	-2,460638973	0,000483976	Hebp1	heme binding protein 1
10442219	-2,458686853	0,00411437	Zfp52	zinc finger protein 52
10481920	-2,458158598	0,003558747	Psmd5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
10401968	-2,458003551	0,004072382	Galc	galactosylceramidase
10346634	-2,448740677	0,003390971	Nop58	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast)
10346722	-2,4483622	0,004070544	Nbeal1	neurobeachin like 1
10438909	-2,442964671	0,009345241	Atp13a3	ATPase type 13A3
10599951	-2,439411256	6,64E-06	1110012L19Rik	RIKEN cDNA 1110012L19 gene
10481845	-2,432373876	0,004933889	Fam125b	family with sequence similarity 125, member B
10430319	-2,428261847	0,003992165	Tst	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial
10440929	-2,422762523	0,005295176	Gart	phosphoribosylglycinamide formyltransferase
10362294	-2,421921324	0,015305335	Arhgap18	Rho GTPase activating protein 18
10574023	-2,417171773	2,58E-17	Mt2	metallothionein 2
10504470	-2,413865012	0,036993813	Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase
10450640	-2,409842735	0,005095538	Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B
10396094	-2,409179687	0,005752213	Klhdc2	kelch domain containing 2
10344723	-2,404973505	0,000124597	Rrs1	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S, cerevisiae)
10554013	-2,401338859	0,005709696	Chsy1	chondroitin sulfate synthase 1
10534456	-2,400909461	0,006788395	Hip1	huntingtin interacting protein 1
10600082	-2,393019246	0,00163717	Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
10428763	-2,391964536	0,006597603	Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2
10486119	-2,38888433	0,000108864	Plcb2	phospholipase C, beta 2
10555303	-2,387718897	0,006837266	Pgm211	phosphoglucomutase 2-like 1
10462881	-2,386822033	0,006738044	Gpr120	G protein-coupled receptor 120
10544252	-2,385373202	0,007309608	E330009J07Rik	RIKEN cDNA E330009J07 gene
10379736	-2,381895302	6,88E-10	1100001G20Rik	RIKEN cDNA 1100001G20 gene
10399036	-2,380264669	0,00733883	Uevld	UEV and lactate/malate dehydrogenase domains
10404885	-2,375740071	0,010659073	Gmpr	guanosine monophosphate reductase
10478012	-2,37525598	9,98E-09	Ube2i	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
10356628	-2,371625148	0,009015391	Hdac4	histone deacetylase 4
10353783	-2,361170136	0,014146315	Ccdc115	coiled-coil domain containing 115
10379989	-2,360281609	0,012390604	Fam33a	family with sequence similarity 33, member A
10604687	-2,3557803	0,010778511	Mmgt1	membrane magnesium transporter 1
10360934	-2,352702658	0,010351931	Rrp15	ribosomal RNA processing 15 homolog (S, cerevisiae)
10363735	-2,351791235	8,52E-10	Egr2	early growth response 2
10395538	-2,350153517	0,00457454	Pnpla8	patatin-like phospholipase domain containing 8
10443391	-2,340949805	0,001586262	Mapk14	mitogen-activated protein kinase 14
10559248	-2,340659373	0,013376913	Tspan32	tetraspanin 32
10439976	-2,338111936	0,045168123	2310061J03Rik	RIKEN cDNA 2310061J03 gene
10408557	-2,329568899	0,014024322	Serpinb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a
10520362	-2,329317014	5,87E-06	Insig1	insulin induced gene 1
10423068	-2,325401772	0,04626242	Rad1	RAD1 homolog (S, pombe)
10345025	-2,323094754	0,00780413	Iars	isoleucine-tRNA synthetase
10557035	-2,322045111	0,015182095	Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E

10508772	-2,320362164	1,90E-06	Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (Fgr) oncogene homolog
10403511	-2,319726952	0,021560765	Heatr1	HEAT repeat containing 1
10424400	-2,318571151	0,023486138	Myc	myelocytomatosis oncogene
10559312	-2,318534188	0,02397473	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase
10556206	-2,314767029	0,02422902	Snora3	small nucleolar RNA, H/ACA box 3
10346668	-2,313830206	0,021684514	Fam117b	family with sequence similarity 117, member B
10471525	-2,312319896	0,018720449	Ptrh1	peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog (S, cerevisiae)
10519945	-2,312113147	0,000940612	Tmem60	transmembrane protein 60
10382852	-2,311033223	0,026314208	Mfsd11	major facilitator superfamily domain containing 11
10538939	-2,309595177	0,033201433	Eif2ak3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
10517967	-2,301210567	0,027608421	Fblim1	filamin binding LIM protein 1
10442454	-2,282038292	0,006680517	Pgp	phosphoglycolate phosphatase
10600403	-2,282019311	8,32E-06	Fam50a	family with sequence similarity 50, member A
10458547	-2,281260185	0,036673267	Gnpda1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
10467068	-2,281217492	0,012542435	Sgms1	sphingomyelin synthase 1
10517116	-2,279518314	0,0016951	Rps6ka1	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1
10385893	-2,276560816	0,027971487	Slc22a4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4
10534216	-2,273845135	0,041675655	Gtf2i	general transcription factor II I
10388880	-2,272490085	0,042444373	Tmem97	transmembrane protein 97
10428857	-2,270775372	0,003754254	Mtss1	metastasis suppressor 1
10367400	-2,26988782	6,41E-05	Mmp19	matrix metalloproteinase 19
10596027	-2,268962869	0,023246073	Il20rb	interleukin 20 receptor beta
10447510	-2,261164575	0,045234401	Amd1	S-adenosylmethionine decarboxylase 1
10460102	-2,260249445	0,040190436	1700034H14Rik	RIKEN cDNA 1700034H14 gene
10412011	-2,257489066	0,000765954	Kif2a	kinesin family member 2A
10550394	-2,254910231	0,012805312	Ptgir	prostaglandin I receptor (IP)
10536541	-2,253191603	0,003471935	St7	suppression of tumorigenicity 7
10448557	-2,242658576	0,001469889	D330041H03Rik	RIKEN cDNA D330041H03 gene
10487945	-2,239665068	0,000253845	Gpcpd1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S, cerevisiae)
10386775	-2,234314078	0,048719554	Prpsap2	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2
10541587	-2,222832131	0,000225014	Clec4a2	C-type lectin domain family 4, member a2
10392284	-2,220937817	0,000209111	Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2
10461022	-2,218083997	4,16E-07	Ppp1r14b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B
10405587	-2,212672604	2,97E-09	Tgfb1	transforming growth factor, beta induced
10521391	-2,198323949	0,000767191	Acox3	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
10438445	-2,191464031	0,037900675	Klhl6	kelch-like 6 (Drosophila)
10433656	-2,19122556	0,046663412	Mkl2	MKL/myocardin-like 2
10357472	-2,183661145	0,000649952	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
10574027	-2,178129905	5,22E-12	Mt1	metallothionein 1
10592126	-2,175614581	0,024253502	Fam118b	family with sequence similarity 118, member B
10532954	-2,169556263	0,00013766	Mlec	malectin
10533844	-2,168346024	1,83E-05	Rilpl2	Rab interacting lysosomal protein-like 2
10452030	-2,157838661	0,009685881	Plin3	perilipin 3
10538282	-2,157394483	0,033133101	Cbx3	chromobox homolog 3 (Drosophila HP1 gamma)
10389269	-2,145461482	0,044682539	Aatf	apoptosis antagonizing transcription factor
10434523	-2,143615273	0,000567288	Polr2h	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H
10604380	-2,142420989	0,010227198	Zdhhc9	zinc finger, DHHC domain containing 9
10587746	-2,129581583	0,003639658	Tmem41b	transmembrane protein 41B
10532711	-2,129528444	0,012281914	Cmklr1	chemokine-like receptor 1
10585599	-2,127371513	0,000485305	Imp3	IMP3, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)
10593671	-2,115811351	0,014397252	Dmx12	Dmx-like 2
10591369	-2,100906563	0,038918185	Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1

10561140	-2,073331782	3,64E-05	Mrpl41	mitochondrial ribosomal protein L41
10491056	-2,071178652	0,004235681	Tb11xr1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1
10413125	-2,070722171	0,004515234	Samd8	sterile alpha motif domain containing 8
10461487	-2,06091928	9,54E-05	Cybas3	cytochrome b, ascorbate dependent 3
10396831	-2,05553224	0,009662411	Arg2	arginase type II
10507594	-2,052060122	0,000130971	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
10499394	-2,03875724	0,029209129	Lmna	lamin A
10430593	-2,034908606	0,013116195	Josd1	Josephin domain containing 1
10525365	-2,023636267	7,54E-08	Hvcn1	hydrogen voltage-gated channel 1
10583732	-2,008112367	0,03313056	Ldlr	low density lipoprotein receptor
10413185	-2,001467237	0,001128244	Zmiz1	zinc finger, MIZ-type containing 1
10411332	-2,000407612	0,009430596	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
10526853	-2,000305008	3,97E-05	Fam20c	family with sequence similarity 20, member C

## ANNEXE 4

**Table S5:** List of 131 genes from the top GO category as in Fig S5A 'Immune system process' associated to increased SUMO-2 binding.

GO:0002376 - immune system process		
Ahr	Foxe1	Lef1
Bcar1	Foxl1	Lmo4
Bcl2	Foxp1	Lta
Bcl2a1d	Fst	Ltb
Bcl2l11	Gbp2	Marco
Bdkrb2	Gbp4	Mbl2
C8a	Gli3	Mpa2l
Casp8	Glr5	Ndr1
Ccl22	Gpr183	Nfatc2
Ccl3	H2-Ob	Nfkb1
Ccl4	Hcls1	Nlr5
Ccl5	Hif1a	Nos2
Ccl6	Hmgb1	Plg
Ccr1	Hs1bp3	Podxl
Ccr4	Icosl	Polm
Cd180	Id2	Pou1f1
Cd1d2	Ifng	Prg4
Cd247	Igf1r	Psen2
Cd24a	Il12a	Ptpn22
Cd40	Il12b	Ptx3
Cd47	Il18	Rsad2
Cd80	Il1a	Runx1
Cd8a	Il1b	Serping1
Cdk6	Il1rn	Six1
Clec4d	Il2	Slc11a2
Clec4e	Il21	Slc7a2
Csf3r	Il27	Sox4
Cx3cl1	Il2ra	Sp3
Cxcl1	Il6	Spn
Cxcl10	Inhba	Tap2
Cxcl11	Irf4	Tbx1
Cxcl15	Irf8	Tgfbr2
Cxcl2	Itgb2l	Tgfbr3
Cxcl3	Itk	Thbs1
Cxcl5	Itpkb	Tm7sf4
Cxcr4	Jak2	Tnf
Dyrk3	Jarid2	Tnfaip3
Edn2	Jun	Tnfaip8l2
Fance	Kdr	Tnfrsf11a
Fas	Kirrel3	Tnfsf15
Fasl	Lbp	Tnfsf18
Fcgr2b	Lck	Tnfsf4
Fgf3	Lcp2	Tnfsf8
		Tpd52
		Ywhaz



## ANNEXE 5

**Table S7:** List of 10 genes from the top GO category as in Fig S5A 'Cytokine activity' associated to increased SUMO-1 binding.

GO:0005125 - cytokine activity

Ccl22
Cx3cl1
Grem1
Ifnk
Il12b
Il1a
Il1b
Ltb
Tnf
Tnfsf8

## ANNEXE 6

**Table S10:** List of 73 repeated DNA elements overexpressed in Ubc9 KO vs WT BMDCs treated by LPS for 6h as determined by RNA-Seq in 3 biological replicates (fold change  $\geq 2$  or  $\leq -2$ ,  $p < 0.05$ , Benjamini and Hochberg)

Repeat name	Adjusted p-value	
	(KO_6h vs WT_6h)	$\log_2(\text{KO}_6\text{h}/\text{WT}_6\text{h})$
MamRep38	4,48E-82	4,520583831
Ricksha_0	4,98E-27	3,529517819
MER89	6,13E-34	3,444156018
RLTR13D3	3,01E-44	2,808241311
(GAAAA)n	5,19E-37	2,70224882
(TTCCC)n	1,94E-35	2,59622
MuRRS-int	2,91E-56	2,512849253
MER73	1,86E-14	2,448852088
RLTR34D_MM	9,78E-27	2,407282185
RLTR13D2	2,83E-11	2,349216496
ERVB2_1-I_MM-int	1,26E-06	2,334469125
LTRIS4A	6,94E-17	2,315081954
IAPEY3-int	2,45E-07	2,314005117
RLTR13A1	1,86E-13	2,208742689
MER89-int	6,76E-14	2,157149624
LTR10_RN	4,73E-31	2,015160933
RLTR10E	6,98E-10	1,865771658
ERVB4_3-I_MM-int	6,15E-10	1,840518814
ORR1A1-int	3,01E-44	1,821337572
MER77	5,37E-15	1,79362586
RLTR30C_MM	6,76E-14	1,787076016
(TTTTA)n	7,26E-16	1,771737321
MTE2b	1,23E-26	1,721913385
LTR103b_Mam	1,90E-16	1,675517319
RLTR12B2	3,87E-21	1,665798362
LTRIS_Mm	2,27E-13	1,621579381
L1MDb	2,10E-21	1,618548989
RLTR9A3	9,35E-15	1,604554562
(TCG)n	1,25E-13	1,563567666
ERVB4_2-I_MM-int	4,01E-05	1,553822921
RMER2	2,15E-40	1,493498392
L1Md_F	7,55E-19	1,47382845
RLTR42-int	6,99E-12	1,469614041
RLTR44C	9,65E-08	1,460931391
RLTR46B	2,75E-18	1,445542784
LTRIS2	8,69E-09	1,439341925
RMER12B	7,33E-18	1,436921031
MLTR18_MM	1,06E-07	1,404115352
RLTR6_Mm	7,08E-07	1,352426231
RMER17A-int	4,43E-07	1,34425174
L1M2a	2,56E-07	1,319399301
(CAAAC)n	4,09E-11	1,309401531
(CCGAA)n	5,11E-06	1,302466775
MLTR73	1,84E-12	1,299855185

L1VL4	2,78E-21	1,289334506
MERV1_LTR	6,44E-06	1,285445513
RLTR17C_Mm	2,48E-15	1,267474046
RLTR12A	1,41E-13	1,258426548
MLTR18C_MM	6,83E-07	1,25710471
RLTR14	1,69E-15	1,24628147
IAPEY4_I-int	1,86E-13	1,238363277
(GGGAGA)n	6,83E-07	1,217393818
MERV1_I-int	2,32E-05	1,211668803
MLT1A1	4,71E-14	1,18499214
MLT2B3	1,16E-10	1,158456224
RMER17C-int	8,14E-10	1,153512178
RMER19B	9,79E-09	1,147969201
RMER16A3	0,013154391	1,132666938
L1M4c	0,000273101	1,127634554
MMVL30-int	0,001157817	1,126592311
(TGAA)n	1,60E-11	1,125301364
MYSERV6-int	1,78E-13	1,108942572
LTR48	3,36E-09	1,107606188
RLTR48A	8,25E-06	1,089154718
ERVB7_1-LTR_MM	0,011137945	1,076383559
RMER16	3,00E-05	1,050888264
(CAAA)n	4,44E-08	1,040122005
RLTR47	0,000347229	1,038409131
RMER16-int	2,89E-06	1,03726645
Lx6	7,69E-13	1,035082207
RLTR20B1	7,33E-07	1,029114303
RLTR19	3,75E-05	1,009387573
RodERV21-int	2,06E-08	1,002969215

## ANNEXE 7

Table S11 : Liste des amorces utilisées dans l'article

Gene	Forward primer	Reverse primer
<b>Mouse</b>		
<i>Actb</i>	ATGAGCTGCCTGACGGCCAGGTC ATC	TGGTACCACCAGACAGCACTGTG TTG
<i>Ccl2</i>	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	GGTCAGCACAGACCTCTCTC
<i>Ccl3</i>	TACAGCCGGAAGATTCCACG	TCAGGAAAATGACACCTGGCT
<i>Ccl4</i>	GCCAGCTGTGGTATTCCTGA	AGCTGCTCAGTTCAACTCCA
<i>Ccl5</i>	GTGCTCCAATCTTGCAGTCG	CTTCTTCTCTGGGTTGGCACA
<i>Cxcl10</i>	AATGAGGGCCATAGGGAAGC	ATCGTGGCAATGATCTCAACAC
<i>Gapdh</i>	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCA G
<i>Hprt</i>	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT G	GATTCAACTTGCCTCATCTTAGG C
<i>Ifit1</i>	TGCTCTGCTGAAAACCCAGA	CTGCCGTCTACTCCTCTTGG
<i>Ifit2</i>	GCTTTGAGCGCTTTGACACA	GTCGCAGATTGCTCTCCAGT
<i>Ifnb1</i>	TCCAGCTCCAAGAAAGGACG	TTGAAGTCCGCCCTGTAGGT
<i>Irf7</i>	TGCTTTCTAGTGATGCCGGG	GCTCAGGAGCCTGTGGTG
<i>Isg15</i>	GAGCTAGAGCCTGCAGCAAT	TCACGGACACCAGGAAATCG
<i>Usp18</i>	CGGACAGACGTGTTGCCTTA	TCCTCTCTTCTGCACTCCGA
<i>Mx1</i>	GAACGTCAGAAGGAAAGAGCTG	ATCGTCTGGCTCTCCTCAGA
<i>Tnf</i>	GTGACCTGGACTGTGGGCCTC	GGCTCTGTGAGGAAGGCTGTG
<i>Il6</i>	ATGCTGGTGACAACCACGGCC	AAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTA
<i>LINE1</i>	TTTGGGACACAATGAAAGCA	CTGCCGTCTACTCCTCTTGG
<i>MusD</i>	GATTGGTGAAGTTTAGCTAGCAT	TAGCATTCTCATAAGCCAATTGCA T
<i>U3I</i>	AGATGTATTGCCAAACACAGG	AGGGGGAATGGGGAGGGAA
<i>U3II</i>	GAACCTTTCCTCACCCGAGA	GAGGAGGAGTTCAGGAATGC
<i>U3III</i>	CTTTTCACCCCAAACCTCCTC	CATCACTAGGGAGTTCTGCCA
<i>U3IV</i>	CCTCAAATGACATTGCCAAA	TTTCACAGGCTTATATAGTAAACT C
<i>Ifnb1 - 15kb_eRNA</i>	GTTCTCTTGGGATGGCTTTG	TGAGTGTTCTTGTGCCTTG
<b>Human</b>		
<i>Gapdh</i>	GGTCGGAGTCAACGGATTTG	ACTCCACGACGTA CT CAGCG
<i>Ifnb1</i>	AAGCAATTGTCCAGTCCCA	TGCATTACCTGAAGGCCAAG

<i>Il6</i>	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	ATTTGTGGTTGGGTCAGGGG
<i>Isg15</i>	CAGCCATGGGCTGGGAC	CTGCCGTCTACTCCTCTTGG
<i>ChIP-qPCR</i>		
<i>Ifnb1 promoter</i>	CAC TGT CTG CTG GTG GAG TT	ATT TCT CCA GCA CTG GGT GG
<i>Ifnb1_exon</i>	GGC TGC TAC CTG CAA GAT GA	GCA CAG GCC ATG AAG GAA GA

## Liste des illustrations

Figure 1 La complexité et la dynamique du protéome généré par l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles..	11
Figure 2 Diversité des modifications post-traductionnelles.....	12
Figure 3 Ubiquitine et immunité : importance fonctionnelle des types de branchement de l'ubiquitine. ....	15
Figure 4 Alignement des quatre paralogues de SUMO chez l'Homme. ....	20
Figure 5 Analyse protéomique des substrats de SUMO .....	21
Figure 6 La cascade de SUMOylation. ....	23
Figure 7 Ligation de SUMO.....	26
Figure 8 Spécificités d'interaction déterminant les sites de SUMOylation. ....	31
Figure 9 Influence de la phosphorylation d'un substrat sur sa SUMOylation .....	33
Figure 10 Contrôle de la SUMOylation par des pathogènes.....	39
Figure 11 Conséquences moléculaires de la modification par SUMO. ....	40
Figure 12 La SUMOylation transitoire de NEMO est nécessaire à la réponse aux dommages à l'ADN.....	42
Figure 13 La SUMOylation joue un rôle d'organisation structurale dans les corps PML. ....	44
Figure 14 Schéma récapitulatif des conséquences de SUMO sur la voie NFkB. ....	52
Figure 15 La SUMOylation régule la voie des IRF. ....	55
Figure 16 Inhibition de la transcription par les protéines PIAS. ....	58
Figure 17 L'inhibition de la SUMOylation provoque l'arrêt de la prolifération des MEFs. .	130
Figure 18 <i>Ubc9</i> est essentielle à la survie des cellules transformées par Ras oncogénique. .	131
Figure 19 Les cellules transformées sont plus sensibles à la perte d' <i>Ubc9</i> que les cellules primaires.....	132
Figure 20 Les cellules déficientes pour <i>Ubc9</i> présentent un cycle cellulaire altéré.....	133
Figure 21 Schéma représentatif de la stratégie expérimentale utilisée pour étudier le rôle de la SUMOylation dans la carcinogenèse colorectale induite par la perte d'APC.....	136
Figure 22 L'hétérozygotie pour <i>Ubc9</i> n'a pas d'effet sur la carcinogenèse colorectale induite par la perte de l'exon 14 d'APC.....	137
Figure 23 L'oncogenèse colorectale induite par l'AOM est inhibée par la perte d'un allèle d' <i>Ubc9</i> .....	139
Figure 24 L'oncogenèse colorectale induite par l'AOM sur colite est inhibée par la perte d'un allèle d' <i>Ubc9</i> . ....	141
Figure 25 UBC9 est induit au cours de la carcinogenèse colorectale chez la souris. ....	142
Figure 26 Le DSS en cure aigüe provoque une colite similaire dans les souris <i>Ubc9<sup>+/+</sup></i> et <i>Ubc9<sup>+/-</sup></i> . ....	144
Figure 27 Le DSS en traitement chronique provoque une colite de gravité similaire dans les souris <i>Ubc9<sup>+/+</sup></i> et <i>Ubc9<sup>+/-</sup></i> . ....	146
Figure 28 Les cellules <i>Ubc9<sup>+/+</sup></i> et <i>Ubc9<sup>+/-</sup></i> présentent des sensibilités similaires à différents agents génotoxiques. ....	148
Figure 29 UBC9 est fortement surexprimée dans les cancers colorectaux humains. ....	149
Figure 30 Clustering non-supervisé de 26 échantillons tumoraux et 13 échantillons sains basé sur le niveau d'expression d'acteurs de la SUMOylation. ....	150
Figure 31 Hypothèse de travail pour la diminution du nombre de polypes dans les souris hétérozygotes pour <i>Ubc9</i> .....	154

## Liste des tableaux

<b>Table 1 : Modification post-traductionnelles apparentées à l'ubiquitine (UBL).</b> .....	17
<b>Table 2 Propriétés des désSUMOylases.</b> .....	24
<b>Table 3 Modulateurs chimiques de la SUMOylation.</b> .....	37
<b>Table 4 Récapitulatif des premières études génétiques de la voie SUMO</b> .....	46
<b>Table 5 Exemples de rôles activateurs et répresseurs de la SUMOylation de facteurs de transcription</b> .....	60
<b>Table 6 Dérégulation des acteurs de la SUMOylation dans différents types de cancers.</b> 65	
<b>Table 7 Substrats de SUMOylation impliqués dans la réparation de l'ADN chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b> .....	67
<b>Table 8 Répartitions des biopsies observées en immunohistochimie selon leur niveau d'expression d'UBC9 et SUMO1.</b> .....	149

## Résumé :

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle réversible permettant de diversifier les fonctions de centaines de substrats. Elle est impliquée dans des processus essentiels à la cellule et à l'organisme, tels que le transport nucléaire, la réparation de l'ADN, la mitose, la transcription. A l'aide de modèles murins génétiquement modifiés déficients pour l'unique enzyme E2 de SUMOylation, UBC9, nous avons pu caractériser les conséquences de la réduction de la SUMOylation sur deux processus : l'immunité innée et l'oncogenèse.

Nous révélons un rôle majeur de la SUMOylation dans la régulation négative du gène codant pour l'IFN- $\beta$ . La dérégulation de ce gène par l'absence d'*Ubc9* a des conséquences importantes sur l'immunité innée, avec une augmentation de l'expression du programme transcriptionnel inflammatoire, une hypersensibilité au choc endotoxique, et une protection contre les infections virales. L'étude du profil de liaison de SUMO sur la chromatine environnant le gène *Ifnb1* a révélé trois nouveaux domaines à potentiel régulateur de la transcription du gène. Enfin, la SUMOylation régule l'expression de rétrovirus endogènes, potentiellement déclencheurs d'une réponse interféron.

Le second axe de recherche a permis de caractériser les conséquences de la réduction de la SUMOylation sur la transformation cellulaire et l'oncogenèse colorectale. Les résultats obtenus montrent une sensibilité accrue des cellules transformées à la perte de SUMOylation comparées aux cellules primaires. De plus, la réduction de moitié de la quantité d'UBC9 réduit le nombre de polypes intestinaux se développant dans les côlons des souris, dans un modèle d'oncogenèse colorectale chimio-induite.

Ces résultats permettent d'affiner nos connaissances sur le rôle de la SUMOylation dans des processus cellulaires majeurs impliqués dans l'oncogenèse et l'immunité innée.

Mots clés : SUMO, Ubc9, immunité innée, transcription, IFN, cancer

## **Investigating the role of SUMOylation in innate immunity and oncogenesis**

### Abstract :

SUMOylation is a reversible post-translational modification modifying the functions of hundreds of proteins. It is implicated in essential cellular and organismal processes, such as nuclear shuttling, DNA repair, mitosis, transcription. Using genetically modified models, deficient for the unique SUMOylation E2 enzyme UBC9, we characterized the consequences of a decrease in global SUMOylation in two processes: innate immunity and oncogenesis.

We reveal a major role for SUMOylation in the negative regulation of the gene coding for IFN- $\beta$ . Deregulation of this gene in the absence of *Ubc9* has dramatic consequences on innate immunity, with increased inflammatory transcriptional program expression, endotoxic shock hypersensitivity, and protection against viral infection. Chromatin binding profile analysis of SUMO surrounding the *Ifnb1* gene revealed three new putative regulatory domains. Finally, SUMOylation regulates endogenous retroviruses expression, potential triggers for interferon response.

Our second research axis allowed the characterization of the consequences of global SUMOylation decrease on cellular transformation and colorectal oncogenesis. Our results show increased sensitivity of transformed cells to SUMOylation loss, when compared to primary cells. Furthermore, decreasing UBC9 levels by half causes a two-fold decrease in intestinal polyp numbers developing in the colon of mice, in a chemically-induced model of colorectal oncogenesis.

Altogether, these results helped increasing our knowledge of the role of SUMOylation in major cellular processes implicated in oncogenesis and innate immunity.

Keywords : SUMO, Ubc9, innate immunity, IFN, transcription, cancer