



HAL
open science

Rôle chromatinien de SUMO dans l'immunité innée et ses implications dans l'immunothérapie des cancers

Victoria Morel

► **To cite this version:**

Victoria Morel. Rôle chromatinien de SUMO dans l'immunité innée et ses implications dans l'immunothérapie des cancers. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS434 . tel-03727616

HAL Id: tel-03727616

<https://theses.hal.science/tel-03727616v1>

Submitted on 19 Jul 2022

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant
Unité Organisation nucléaire et Oncogénèse

Rôle chromatinien de SUMO dans l'immunité innée et ses implications dans l'immunothérapie des cancers

Par Victoria Morel

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Anne Dejean

Présentée et soutenue publiquement le 4 Novembre 2021

Devant un jury composé de :

Mme Sophie POSTEL-VINAY

Rapporteur

M. Guillaume BOSSIS

Rapporteur

Mme Valérie LALLEMAND-BREITENBACH

Examinatrice

M. Olivier JOFFRE

Examineur

M. Frédéric DEVAUX

Examineur

Mme Anne DEJEAN

Directrice de thèse



« Le doute est une force. Une vraie et belle force.
Veille simplement qu'elle te pousse toujours en avant. »

Pierre Bottero

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury Valérie Lallemand-Breitenbach, Olivier Joffre et Frédéric Devaux qui me font l'honneur de leur présence et de leur expérience pour juger mon travail lors de cette soutenance, et en particulier à Sophie Postel-Vinay et Guillaume Bossis qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci d'avoir pris de votre temps.

Je remercie Anne Dejean de m'avoir accueilli dans son laboratoire sur la base d'un coup de téléphone passé depuis Memphis. Ta confiance, tes conseils scientifiques et l'indépendance que tu m'as laissée m'ont permis d'évoluer et de m'épanouir dans ce fantastique domaine qu'est la recherche.

Merci à l'ensemble de l'équipe ONO qui a ajouté de la joie, de la bonne humeur et des rires à chacune de ces années passées ici :

Pascal, mon colocataire de bureau. Je n'aurais pu tomber sur une meilleure personne pour partager cette pièce et ces années. Merci infiniment pour tout : ton soutien, les débats (toujours animés et passionnés !), tes conseils, tes histoires, les connaissances partagées, les blagues, les rires et les bonbons. Merci d'être la personne que tu es et de me rappeler la personne que je suis, scientifiquement et humainement. Si tous les êtres humains étaient comme toi, le monde serait plus beau, il n'y aurait plus de cancer du foie et il y aurait beaucoup moins de samoussas. Je te remercie d'avoir relu mon manuscrit malgré la charge de travail que tu avais.

Agnès, travailleuse acharnée, bricoleuse et danseuse le reste du temps, dont j'ai partagé le labo durant ces quatre années. Sous une blouse blanche se cachent de magnifiques tenues colorées, à l'image de la personne que tu es !

Jack, chercheur pédagogue, disponible et doué tout en étant capable de sauter dans une piscine glacée à 5h du mat' et de faire le tour des bars ! Merci Jack pour ton aide précieuse, l'exemple que tu es pour nous, jeunes chercheurs en devenir, pour ta patience et ta gentillesse, toujours ! Merci également de faire honneur au rhum réunionnais et j'ai hâte de voir ton déguisement.

Alex, toujours là pour rire, faire des blagues (la plupart du temps pas très catholiques !), organiser et participer à des activités et des sorties, mais aussi pour écouter, soutenir et

conseiller ! Je n'oublie pas également ces nombreuses heures à l'animalerie et les longues journées de dissection qui se finissent par des conversations sans queue ni tête devant le FACS. Continue longtemps d'être ce soutien personnel et professionnel aux doctorants d'ONO ! Je note aussi que contrairement à nous autres, tu n'as pas besoin d'être bourrée pour finir dans un état presque plus déplorable que le nôtre, et je ne te remercie pas pour le super voyage à Marolles beach !

Jacob, mon maître de stage (ça commence à faire loin !), grand spécialiste du microscope et des protocoles maisons et mélomane dans l'âme ! Merci pour ton aide tout au long de ces années et pour toutes ces discussions !

Amandine, ma partenaire de travail cette dernière année, avec qui on a partagé beaucoup de rires, de protocoles ratés (mais l'important c'est de toujours persévérer, même quand on travaille avec de l'eau !) et de cocktails aux œufs ! Merci pour ce binôme de choc que nous avons formé, nous nous sommes complétés à tous les niveaux professionnellement et humainement parlant ! Restes comme tu es, et j'espère te retrouver à Europa-Park chaque année !

Shireen, who found the good blue!! When you arrived, alone in the middle of a Mondial pandemic, in a country you didn't know, we were worried about you! But then, I realized that your joy of living, your enthusiasm, and the way you see the world were stronger than all of that! I also found a partner in crime when it comes to dessert! Thanks et let's have daaru!

Tatiana, post-doc talentueuse, qui vient d'ici et d'ailleurs, courageuse et au grand cœur (tiens, ça rime !) ! Merci pour ton aide, ton sourire, ta disponibilité, ta zénitude en toutes occasions et de m'avoir fait rêver en me racontant le Canada !

Yann, capable de créer des figures en moins de temps qu'il n'en faut pour que je les lui demande ! Merci d'avoir pris beaucoup de ton temps pour moi alors que tu étais déjà très, très occupé, surtout lors de la rédaction de cette thèse qui a corrélée avec la réception de big data. Sans toi, je n'aurais pas pu présenter la moitié des résultats présents dans ce manuscrit ! Merci aussi pour les bons plans sur la Grèce, et les conversations sur les différents rhums, c'est toujours très agréable !

Samia, sur tous les fronts malgré notre totale ignorance la plupart du temps des démarches administratives ! On ne peut pas dire qu'on te facilite la tâche, et pourtant tu restes un soutien sans faille pour toute l'équipe qui ne saurait être complète sans toi. Merci pour tout-

professionnellement parlant mon dossier a été un vrai casse-tête à gérer-, mais aussi merci pour les pauses café et les discussions entre filles (ou pas d'ailleurs !).

Sophie, merci pour ta présence discrète mais essentielle, ton sourire à toute épreuve et ta volonté d'aider toujours plus !

Merci aux anciens du labo et que j'ai eu la chance de croiser au cours de ma thèse : Thibaut pour ta gentillesse, ton soutien, les pauses cafés et maintenant les pauses cocktails, Elma pour les conversations passionnantes et ton enthousiasme sans fin, Juan-Pablo pour ton cœur et ton caractère en or, Ying et Pablo pour votre calme même en situation de crise et votre extrême gentillesse, Nacho pour tes bons plans goûter, ton soutien et ta bonne humeur, Coraline pour ton grain de folie et ta joie de vivre, Claudia pour ton aide en bioinfo et ta gentillesse, Lucas pour ton petit côté extravagant qui apportait du pep's, Pierre-François pour le sourire que tu avais toujours aux lèvres, Jota pour ton empathie, ton humanité et tes câlins tout le temps et à tout le monde et à Cathy pour toutes ses années de travail pour nous faciliter la vie. Merci également à Pierre Thiollais, légende vivante et meilleur Père-Noël d'ONO !

Je remercie également Nir et Greg, merci pour les blagues et les discussions sympathiques autour de la machine à café. Greg, merci aussi pour ton aide sur les protocoles, ta disponibilité dès que j'avais une question ou besoin d'un conseil, tes blagues et tes anecdotes.

Merci à Jean-Marc Cavaillon, mon tuteur de Pasteur, qui en plus d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse, a libéré de son temps afin de me rappeler ce qu'était réellement la recherche et m'a prodigué de nombreux conseils. Vous êtes un exemple à suivre pour moi.

Je remercie les membres de mon comité de thèse Robert Weil, Vincenzo Di Bartolo et Thierry Jaffredo pour avoir participé au bon déroulement de ma thèse.

Je souhaite également remercier mes amis. Je voulais tous vous citer un à un, mais j'ai la chance d'être bien entourée, vous êtes nombreux et méritez chacun un paragraphe (qui peut se transformer en roman avec moi, on le sait bien, n'est-ce pas Flo'?). Je vais donc m'en tenir à un paragraphe groupé, mais vous vous reconnaitrez. Vous êtes les doux dingues qui m'accompagnaient à chaque étape de ma vie, depuis mes 3 ans (coucou les filles !) à maintenant. Vous avez rejoint le wagon au collège (hey rhodo !), au lycée (c'toi !), en prépa (« ma vie est nulle ! »), au Magistère (« c'est beau le bismuth ! »), au détour d'un livre (« taraddicte un jour, taraddicte tou... *SBAF !* ») ou du conservatoire (à nos batailles lors des pique-niques et à nos comédies musicales !). Je vous ai parfois découvert grâce à nos proches

en commun ou lors de circonstances particulières, et on ne s'est plus jamais quittés ! Vous êtes là dans les bons comme dans les mauvais moments, au quotidien et lors des événements, vous êtes mon harnais de sécurité et ma bouée (on l'a bien vu en Croatie !). Je vous souhaite encore de longues années d'amitié et j'espère tous vous inviter au ski dans notre villa au bord du lac (oui, et même qu'il y aura 20 chambres, une piscine et une salle de cinéma pour tous vous accueillir) !

Je remercie bien évidemment ma famille, en commençant par mes parents, arrivés de l'île de la Réunion à 17 ans à peine avec 100 francs en poche. Ma réussite est avant tout la vôtre, et votre fierté est la mienne. Sans votre travail, je n'aurais jamais pu être là où j'en suis actuellement, sans vos principes et vos valeurs, je ne serais pas la personne que je suis et que je suis fière d'être. Je prends mon envol comme vous avez pris le vôtre, mais pas d'inquiétudes, je serai à moins de 10 000 km de vous. Mi aim a zot !

Stef, Toto, je suis fière de notre fratrie, toujours là l'un pour l'autre en toutes circonstances. Il est loin le temps où nous nous battions avec le grand (la prise s'en souvient) et où le petit me lançait des couteaux ! Maintenant, les photographes nous demandent de nous faire des bisous et de se prendre dans les bras (parfois même on le fait de nous-même !). Soyons à vie des frères et sœurs soudés, joyeux et aimants les uns avec les autres, continuons à nous moukater un bon peu, et même si le rhum lé pas bon mem, boir a li kan mem !

Anaïs, avant j'aurais pu te dire que tu étais ma belle-sœur préférée mais j'en connais une qui ne serait pas contente, et puis ce n'est pas vrai de toute façon (je rigole, pas taper !!). Merci d'illustrer le mot « famille », toujours là quand on en a besoin, pas la dernière pour moukater, rigoler et chanter ! Merci (et à Stef aussi bien entendu) de m'avoir offert le cadeau inestimable d'être tatie et marraine de deux merveilles. Ma Laulau, à 7 ans et demi tu es déjà plus mature que tonton Maxime et tu le bats au UNO ! Restes comme tu es, une nièce formidable, au grand cœur, qui ne s'arrête jamais, et une grande sœur admirable et dévouée ! Tatie t'aime fort et sera toujours là pour toi ! Maïlone, fraîchement arrivé dans la famille, l'idée de te rencontrer m'a donné du courage lors de l'écriture de ce manuscrit et te prendre dans mes bras pour la première fois a été une bouffée d'amour et d'oxygène qui m'a permis d'avancer toujours plus loin sur la route de l'accomplissement et du bonheur. La fierté et la joie d'être ta marraine achève de faire de cette année 2021 une année inoubliable et inestimable !

Britany qui se marie « demain » avec Toto ! Enjouée, enthousiaste, souriante, radieuse et toujours prête à faire un vlog ! Merci de ta bonne humeur et de ta fraîcheur en toutes

circonstances, restes comme tu es, une femme au grand cœur et qui aime mon petit frère. Un jour, on fera Pékin express ensemble et ça sera inoubliable (certainement à nos dépends !).

Ma petite mamy, toujours à l'écoute et toujours présente malgré le continent et les 10 000 km qui nous sépare. Mon roc, mon pilier ! Merci mamy d'être toujours là pour moi, que ça soit par téléphone, en métropole ou encore à la Réunion ! Merci pour les zembrocal, les carry et le grain et pour tout, tout, le reste !

Merci à Claire et Jean-Marc (je vous ai appelé par votre prénom !), mes beaux-parents, pour leur soutien, et pour m'avoir confié leur fils. Ce n'est pas un cadeau, mais je l'accepte quand-même ! Je rigole bien entendu, et ne vous inquiétez pas, on vit et on vivra heureux !

Merci à ma très grande famille, qui s'est encore agrandi avec les Boy ! L'amour que j'ai pour vous tous est sans limite ! Je ne citerai pas tous les noms car cette thèse n'en finirait jamais, mais ces mots vous sont dédiés. J'ai une chance incroyable d'avoir une famille aussi aimante et présente, une famille de musiciens, de fêtards, qui savent aimer et vivre ! Je ferai en sorte de toujours garder la chaleur de la Réunion, nos belles valeurs, et de perpétuer la tradition.

J'ai une pensée toute particulière pour papy Noël, papy Michel, mamy Lise et mon parrain. Je vous dédie cette thèse car je sais que vous m'accompagnez chaque jour, que vous êtes là pour me guider. Vous êtes ma lumière dans l'obscurité et même si ces dernières années ont été comme un raz-de-marée sur notre enfance, vous êtes la force qui me pousse en avant et les souvenirs radieux d'antan.

« Le meilleur pour la fin » me dira Monsieur Max aux chevilles gonflées ! Mais non, je vais plutôt dire « le meilleur reste à venir » ! Max, la vie ne fait que commencer pour nous, pour la famille que nous formons, toi et moi, de grandes aventures nous attendent encore ! Je te remercie de partager ma vie et d'éclairer mon chemin depuis bientôt 7 ans. Je n'aurais jamais pu traverser toutes ces épreuves et anticiper l'avenir avec autant de confiance et de sérénité sans toi. Tout me semble réalisable tant que tu es avec moi, sauf peut-être prendre un bain...les meilleurs savent (ainsi que ceux qui ont soudoyés les meilleurs !!) ! On n'a pas pu m'appeler « docteur » lors de notre grand jour contrairement à toi, mais moi j'ai la chance de pouvoir t'appeler « mon mari » dans ces remerciements. Alors, mon cher mari, merci pour ton soutien, pour tes rires, pour notre complicité, nos voyages, les titi déjeuners et surtout pour ton amour !

Collaborations

Merci également à tous mes collaborateurs, sans qui ces projets n'auraient pu aboutir :

Ivo Hendriks et Michael Nielson, du BRIC à Copenhague au Danemark, pour la réalisation des SUMOylomes.

Sebastian Amigorena, Leticia Niborski, Burbage Marianne, Derek Rookhuizen et Sandrine Heurtebise de l'institut Curie pour l'étroite collaboration sur la partie immunothérapie. Merci de vous être rendu disponibles pour les réunions, de m'avoir fourni, montré et expliqué la plupart des protocoles employés dans cette étude et gentiment donné les cellules B16F10. Merci en particulier à Leticia de s'être déplacée plusieurs fois à l'institut Pasteur afin de nous aider lors des premières et longues journées de FACS ainsi que pour toutes l'aide qu'elle nous a apporté au cours de ce projet.

Sandrine Schmut, Sophie Novault et Sebastien.Megharba, la super team de la plateforme de cytométrie de Pasteur pour leur aide précieuse sur l'établissement du panel 17 couleurs, la manipulation du Symphony et lors de la réalisation du scRNA-seq. Merci à Sandrine pour son immense aide sur l'analyse des résultats de FACS qui a nécessité de longues heures de travail et un ordinateur très puissant. Merci également à Pierre-Henri Commere pour les tris des cellules satellites.

Brendan Evano et Shahragim Tajbakhsh de l'Unité de Cellules Souches et Développement à l'Institut Pasteur pour leur expertise sur le modèle musculaire *in vitro* et pour les souris Tg:Pax7-nGFP.

David Hardy et Johan Bedel, de l'unité de Neuropathologie expérimentale à l'institut Pasteur pour les coupes et les marquages des tissus ainsi que pour l'aide sur l'analyse et les nombreux conseils. Merci également à David pour sa précieuse aide sur les modèles de lésion *in vivo*.

Fred Relaix, de l'Institut Mondor pour son aide sur les modèles musculaires *in vivo*.

Merci à Sorbonne Université pour le financement de mes trois premières années de thèse et à la Ligue Contre le Cancer pour le financement de ma dernière année de thèse.

Enfin, un grand merci à tous les excellents scientifiques qui ont croisés mon chemin, et m'ont guidé dans cette voie grâce à leurs conseils et leur expertise.

Table des matières

Remerciements	2
Collaborations.....	7
Table des matières	8
Tables des figures et tableaux.....	12
Liste des abréviations utilisées	14
Introduction générale.....	17
I. Les modifications post-traductionnelles	20
A. Diversité des modifications post-traductionnelles	20
B. L'ubiquitination.....	21
C. Les protéines « Ubiquitine-like »	24
II. La SUMOylation.....	26
A. Généralités sur SUMO	26
B. Le processus enzymatique de la SUMOylation.....	30
1. Maturation et désSUMOylation	31
2. Activation de SUMO par l'enzyme E1	32
3. Conjugaison de SUMO par l'enzyme E2.....	33
4. Ligation de SUMO par les enzymes ligases E3	33
5. Séquences régulatrices de la SUMOylation	35
a) Motif consensus de SUMOylation	35
b) Dérivés du motif consensus de SUMOylation	36
c) Les SIMs.....	37
d) SUMOylation dépendante d'une E3 ligase.....	38
6. Nombre de substrats modifiés	39
C. Interactions entre la SUMOylation et d'autres modifications post-traductionnelles.....	40
1. Ubiquitination.....	41
2. Phosphorylation.....	43
3. Acétylation	44
4. Interconnexion entre les différentes modifications.....	44
D. Modèles d'études de la SUMOylation.....	45
E. Rôles de la SUMOylation.....	47
1. Impact de la SUMOylation sur ses substrats	47
a) Changement conformationnel des substrats	48
b) Compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles	48
c) Modifications des interactions entre protéines	48

d) Stabilisation des complexes protéiques.....	49
2. Rôles nucléaires de SUMO	49
a) Impact de SUMO sur la transcription.....	50
b) SUMO et modification des histones	53
c) SUMO et régulation de la chromatine.....	54
3. SUMO et stress cellulaires	55
4. SUMO et cancer.....	57
III. SUMO et immunité anti-tumorale	61
A. Introduction à l'immunité anti-tumorale.....	61
B. Immunité anti-tumorale naturelle	64
1. Les sceaux du cancer	64
2. L' « immunoédition » ou la « théorie des 3E ».....	65
a) La phase d'élimination.....	67
(1) Effecteurs de l'immunité innée.....	67
(2) Effecteurs de l'immunité adaptative.....	70
(3) Mécanisme d'action anti-tumorale des effecteurs	71
b) La phase d'équilibre.....	75
c) La phase d'échappement	76
C. Induction de l'immunité anti-tumorale : immunothérapie	78
1. Définition.....	78
2. Classification et principe des immunothérapies	78
3. Combinaison d'immunothérapies.....	81
D. Rôle de SUMO dans l'immunité anti-tumorale	82
1. SUMO acteur de l'immunité innée	82
a) Voie NF- κ B.....	83
b) Voie IRF	85
c) Voie cGAS-STING	87
d) Voies des MAPK.....	87
2. Sumo au cœur de l'immunité croisée.....	88
3. SUMO comme cible directe dans le traitement contre le cancer	90
IV. SUMO et régénérescence musculaire	91
A. SUMO et identité cellulaire	91
1. Impact de SUMO sur l'identité des cellules souches.....	91
2. SUMO et conversions cellulaires induites	92
B. Le modèle de régénération du muscle squelettique.....	94
C. Rôle de SUMO dans la différenciation des myoblastes.....	100

1.	Rôles controversés dans des modèles de différenciations musculaires	100
2.	Contrôle des facteurs impliqués dans la myogenèse	101
	Objectifs de la thèse	104
	Résultats	105
I.	SUMOylome	106
A.	Contexte général de l'étude	106
B.	Présentation et validation du modèle d'étude	106
C.	Validation des SUMOylomes endogènes de macrophages murins	110
D.	Analyse des substrats différenciellement hyperSUMOylés	115
E.	Analyse des substrats différenciellement hypoSUMOylés	123
F.	Impact de l'hypoSUMOylation sur le mécanisme d'action du complexe EP400/TIP60	126
G.	Analyse globale des protéines différenciellement SUMOylées	131
H.	Conclusion	135
II.	SUMO et immunité anti-tumorale	136
A.	Contexte général de l'étude	136
B.	Une hypoSUMOylation globale couplée à une thérapie anti-PD-1 entraîne un délai de croissance tumorale	136
C.	Une perte partielle de SUMO dans la lignée myéloïde associée à un traitement anti-PD-1 entraîne un retard de croissance tumorale	139
D.	Une hypoSUMOylation globale associée à un traitement anti-PD-1 modifie les proportions de populations immunitaires	142
E.	La voie interféron de type I semble impliquée dans la réponse anti-tumorale induite par l'hypoSUMOylation couplée à la thérapie anti-PD-1	147
F.	Représentations graphiques du scRNA-seq des cellules immunitaires infiltrant la tumeur de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-}, traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1	152
G.	Un déficit de la voie SUMO couplé au traitement anti-PD-1 entraîne la présence d'une proportion plus élevée de cellules T cytotoxiques dans la tumeur	157
H.	L'hypoSUMOylation couplée au traitement anti-PD-1 entraîne une diminution des macrophages présentant un phénotype M0/M2 pro-tumoral	160
I.	Signature interféron de type-I selon les groupes de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1	163
J.	Conclusion	165
III.	SUMO et régénération musculaire	166
A.	Contexte général de l'étude	166
B.	Une hypoSUMOylation entraîne une myogenèse accélérée <i>in vitro</i>	167
C.	SUMO est un régulateur de la myogenèse <i>in vivo</i>	172
D.	Conclusion	181
		190

Discussion et perspectives	194
I. Considérations globales	195
Effet dose et contexte-dépendant de SUMO.....	195
II. SUMO et immunité	196
A. SUMOylation	196
Les substrats responsables de la régulation directe de <i>l'Ifnb1</i> seraient-ils spécifiques à SUMO-1 ?	196
La SUMOylation induit-elle une activité de répresseur actif à Maff ?.....	197
Régulation par sumo des « <i>immediate early-genes</i> » ?	198
Sumo entraînerait-elle une mémoire épigénétique de l'immunité ?.....	199
B. SUMO et immunité anti-tumorale	201
Effet d'addiction non-oncogénique de SUMO ?.....	201
La SUMOylation induit-elle une modification du phénotype des cellules immunitaires ?.....	202
Modèles tumoraux plus physiologiques pour l'étude de SUMO.....	202
C. Sumo, rétroposons, immunité innée et anti-tumorale	203
SUMO régulerait-il la réponse immune innée et anti-tumorale <i>via</i> la répression des rétroposons ?	203
.....	203
III. SUMO et régénération musculaire	205
Une hypoSUMOylation affecterait-il le mode de division des cellules souches satellites ?.....	205
SUMO agirait-il sur la structure des fibres ?	206
Quel est l'impact de la SUMOylation sur la sénescence dans un contexte de régénération musculaire ?.....	207
Rôle régulateur de SUMO dans l'immunité et impact sur la régénération musculaire.....	207
IV. SUMO et hyperinflammation	208
SUMO jouerait-il un rôle dans l'équilibre pro et anti-destruction tissulaire <i>via</i> son action sur les leucocytes ?.....	208
Conclusion	210
Matériel & Méthodes	212
Références bibliographiques	224
Annexes	252

Tables des figures et tableaux

Figure 1 : Du génome au protéome.....	19
Figure 2 : Diversité des modifications post-traductionnelles.....	21
Figure 3 : Différents types d'ubiquitination et fonctions associées.	23
Figure 4 : Alignements des séquences protéiques de l'Ubiquitine et des quatre paralogues de SUMO chez l'Homme.....	27
Figure 5 : Comparaison de la structure de l'Ubiquitine et de SUMO-1.....	28
Figure 6 : La cascade de SUMOylation.....	30
Figure 7 : « Ice logo » du site consensus de sumoylation.	37
Figure 8 : Spécificité des interactions déterminée par les sites de SUMOylation.....	39
Figure 9 : Cartographie des sites de SUMOylation selon les organes chez la Souris.....	40
Figure 10 : Compétition entre SUMO et l'ubiquitine au niveau de la lysine du facteur de transcription IκB-α.	41
Figure 11 : Schéma du mode d'action de RNF4 via les interactions entre les StUbls et SUMO.....	42
Figure 12 : Signalisation complexes via l'interconnexion entre la SUMOylation et différentes modifications post-traductionnelles.....	45
Figure 13 : Conséquences moléculaires de la SUMOylation sur les substrats.....	47
Figure 14 : Effets principaux de la SUMOylation sur les structures et les fonctions nucléaires.	50
Figure 15 : Différents mécanismes de régulation de la transcription par SUMO.....	51
Figure 16 : Rôle de la SUMOylation des facteurs de transcription dans la spécificité du site de liaison.....	52
Figure 17 : Dynamique de SUMO en réponse à un stress protéotoxique.....	56
Figure 18 : Implication de la voie SUMO dans le cancer.	58
Figure 19 : Exemples de suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes modifiés par SUMO.....	59
Figure 20 : Les six sceaux du cancer.....	64
Figure 21 : Actualisation des sceaux du cancer.	65
Figure 22 : Le concept d'immunoédition du cancer.....	66
Figure 23 : Voies de signalisation de l'IFN-I.....	73
Figure 24 : Action de l'IFN-I sur les cellules immunitaires.....	75
Figure 25 : Principe de l'immunothérapie par anti-PD-1/PD-L1.	80
Figure 26 : Régulation de la voie NF-κB par la voie SUMO.	84
Figure 27: Rôle de la SUMOylation dans la voie interféron.	86
Figure 28 : Un déficit de la SUMOylation induit une réponse massive et constitutive d'IFN-β.	88
Figure 29 : Action inhibitrice distale de la SUMOylation sur l'activité du promoteur <i>Ifnb1</i>.	89
Figure 30 : SUMO est un gardien majeur de l'identité cellulaire.....	93
Figure 31 : Structure du muscle squelettique et localisation des cellules satellites.	95
Figure 32 : Profil d'expression des principaux régulateurs myogéniques au cours de la régénération du muscle squelettique. Adapté de Bentzinger et al., 2012.	96
Figure 33 : Dynamique des cellules inflammatoires lors de la régénération musculaire.....	97
Figure 34 : Images représentatives du processus de régénération musculaire après induction d'une blessure.	98
Figure 35 : Validation de la réponse massive IFN-I induite par l'hypoSUMOylation provoquée par le MI-792.....	110
Figure 36 : Résumé et validation de la technique utilisée pour les SUMOylomes endogènes. ...	112
Figure 37 : <i>Volcano plot</i> des protéines différentiellement SUMOylées sous stimulations pathogéniques.	115

Figure 38 : Substrats différentiellement hyperSUMOylés sous stimulations LPS et poly(I :C).	120
Figure 39 : Etude du facteur de transcription Maff, hyperSUMOylé sous stimulations LPS et poly(I :C).	122
Figure 40 : Substrats différentiellement hypoSUMOylés sous stimulations LPS et poly(I :C).	126
Figure 41 : Impact de l'hypoSUMOylation sur la déposition et le retrait d'H2AZ et d'H3.3 par le complexe EP400/TIP60.	131
Figure 42 : Analyse ontologique des substrats hypo- et hyperSUMOylés.	134
Figure 43 : Schéma récapitulatif de l'étude des SUMOylomes de macrophages murins stimulés ou non.	135
Figure 44 : Induction d'un délai significatif de croissance tumoral lors d'une hypoSUMOylation globale couplée à de l'immunothérapie par anti-PD-1.	139
Figure 45 : Induction d'un délai de croissance tumorale lors d'une hypoSUMOylation dans la lignée myéloïde couplée à de l'immunothérapie par anti-PD-1.	142
Figure 46 : Modification des proportions de populations immunitaires induite par une hypoSUMOylation globale couplée au traitement anti-PD-1.	146
Figure 47 : Implication de la voie interféron de type I dans le délai de croissance tumorale induit par l'hypoSUMOylation + anti-PD-1.	148
Figure 48 : Modification des proportions de cellules immunitaires lors d'une hypoSUMOylation globale couplée à une déficience en récepteur des IFN-I.	152
Figure 49 : Regroupement des cellules immunitaires CD45.2⁺ infiltrant la tumeur des souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.	154
Figure 50 : Représentation des principaux types cellulaires parmi les cellules CD45.2⁺ infiltrant la tumeur de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-}, traitées ou non avec de l'anti-PD-1.	156
Figure 51 : Augmentation de la proportion de cellules T cytotoxiques chez les individus Ubc9^{+/-} + anti-PD-1.	160
Figure 52 : Diminution de la proportion de macrophages naïfs et pro-tumoraux lors d'une hypoSUMOylation couplée à la thérapie anti-PD-1.	162
Figure 53 : Signature interféron de type-I selon les groupes de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.	164
Figure 54 : Schéma récapitulatif de l'action d'une hypoSUMOylation couplée à un traitement anti-PD1 <i>In vivo</i>.	165
Figure 55 : Prolifération accrue des cellules souches satellites hypoSUMOylées.	169
Figure 56 : Différentiation précoce des cellules souches satellites hypoSUMOylées.	172
Figure 57 : Régénération musculaire de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} après induction d'une blessure par BaCl₂ au niveau du tibia antérieur.	177
Figure 58 : Meilleure régénération musculaire des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/-}.	180
Figure 59 : Schéma récapitulatif de l'action de la voie SUMO sur les étapes de myogenèse <i>In vitro</i> et la régénération musculaire <i>In vivo</i>.	181
Figure 60 : Augmentation du niveau d'expression des RLTR45 sous ML-792.	204
Tableau 1 : Liste des protéines « ubiquitine- like » connues chez les Mammifères.	25
Tableau 2 : Propriétés des différentes désSUMOylases.	32
Tableau 3 : Mécanisme d'action anti-tumorale des effecteurs de l'immunité innée et adaptative.	72
Tableau 4 : Classification et fonctionnement des principales immunothérapies.	80
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le panel de FACS 17-couleurs	223
Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR	223
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour la mutagénèse dirigée de Maff.	223

Liste des abréviations utilisées

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity	DAXX	Death domain associated protein
ADN	Acide désoxyribose nucléique	DC	Dendritic cell
AMP	Adénosine monophosphate	Desi1	DeSUMOylating isopeptidase 1
AMPC	AMP cyclique	Desi2	DeSUMOylating isopeptidase 2
ANG-1	Angiopoïétine-1	DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
AP1	Activating protein-1	DUB	Déubiquitinase
AR	Acide rétinoïque	EGR1	Early growth response-1
ARN	Acide ribonucléique	ELK-1	ETS transcription factor ELK1
ASCL1	Achaete-scute family BHLH transcription factor 1	EMT	Epithéliale-mésenchymateuse
ATF	Activating transcription factor	ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	ER- α	Estrogen receptor- α
B7-H1	B7 homolog 1	ESC	Embryonic stem cell
BCG	Bacille de Calmette et Guérin	FAP	Fibro/Adipogenic progenitor
BLM	Bloom syndrome recQ helicase-like protein	FDA	Food and drug administration
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell	FOS	FBJ Osteosarcoma oncogene
BMP2	Bone Marrow Protein 2	FT	Facteur de transcription
BRN2a	Brain-2	GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
BZEL	BTB-ZF protein expressed in effector lymphocytes	GCM1	Glial cell missing 1
BZIP	Basic region leucine zipper	GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
CAR	Chimeric antigen receptor	H&E	Hematoxyline et l'Eosine
CBC	Crypt base columnar cell	H2O2	Peroxyde d'hydrogène
CBX4	ChromoBoX 4	HCSM	Hydrophobic cluster SUMOylation Motif
CD1d	Cluster de différenciation 1	HDAC	Histones désacétylase
CD8	Cluster de différenciation 8	HDAC1	Histone Deacetylase 1
CEBP β	CCAAT/enhancer-binding protein beta	HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1 α
cGAMP	Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate	HIPK2	Homeodomain-interacting protein kinase
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	HP1 γ	Heterochromatin protein 1 γ
CHC	Carcinome hépatocellulaire	HSF1	Heat Shock Factor 1
ChiP-seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing	IC	Immune Checkpoint
Chk-1	Checkpoint kinase 1	IEG	Immediate early-gene
Chk-2	Checkpoint kinase 2	IFNAR	Interferon- α/β receptor
CK2	Casein Kinase 2	IFN-I	Interférons de type I
CPA	Cellules présentatrices d'antigènes	IFN γ	Interféron γ
CRM1	Chromosomal Maintenance 1	IKK	I κ B kinase
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	IL-10	Interleukine-10
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	iPSC	Induced pluripotent stem cell
DAMP	Damage associated molecular pattern	IRF	Interferon regulatory factor
		ISG	Interferon-stimulated gene
		ISG15	Interferon stimulated gene 15
		ISRE	Interferon-stimulated response element
		I κ B α	Inhibitor of kappa-b alpha

JNK	Jun N-terminal Kinase	PE	Phosphatidylethanolamine
KLF4	Kruppel-like factor 4	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
LAG-3	Lymphocytes activation Gene 3	Pias1	Protein inhibitor of Activated STAT1
LAP	Leucémie aiguë promyélocytaire	Pic1	PML-interacting clone 1
LPS	Lipopolysaccharide	PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate
LTE	Long terminal repeat	PML	Promyelocytic leukemia
LT $\gamma\delta$	Lymphocytes T $\gamma\delta$	PML-RAR α	Promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha
MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma	PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated Receptor γ
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	PRR	Pattern recognition receptor
MAVS	Mitochondrial antiviral signaling	pVHL	Von Hippel-Lindau protein
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5	RanBP2	RAN Binding Protein 2
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells	RanGAP1	RAN GTPase-activating protein 1
MEC	Matrice extracellulaire	RB	RetinoBlastoma protein
MEF	Mouse embryonic fibroblast	RIG-I	Retinoic acid-inducible gene I
MEF2A	Myocyte enhancer factor 2 A	RING	Really Interesting New Gene
MEK1	MAP/ERK kinase-1	RNAi	Ribonucleic acid interference
MEK2	MAP/ERK kinase-2	RNF4	Ring finger protein 4
MIC	MHC class I chain-related protein	ROS	Reactive oxygen species
MICA	MHC Class I polypeptide-related Sequence A	SAE1	SUMO-activating enzyme subunit 1
MICB	MHC Class I polypeptide-related Sequence B	SAE2	SUMO-activating enzyme subunit 2
MIF2	Mitotic fidelity of chromosome transmission protein 2	SATB1	SATB Homeobox 1
MRF	Myogenic regulatory factor	SBM	SUMO binding motif
MRF4	Myogenic regulatory factor 4	SEN1	Sentrin-specific protease 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin	SEN2	Sentrin-specific protease 2
MYF5	Myogenic Factor 5	SET7	SET domain containing lysine methyltransferase 7
MyHC	Myosin heavy chain	SET9	SET domain containing lysine methyltransferase 9
MYOD	Myoblast determination protein	SETDB1	SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1
MYT1L	Myelin transcription factor 1 like	shRNA	Small hairpin RNA
NDSM	Negatively charged amino-acid-Dependant SUMOylation Motif	SI	Système immunitaire
NEMO	Nuclear NF- κ B essential modifier	SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells	SIM	SUMO Interacting Motif
NF κ B	Nuclear Factor kappa B	siRNA	Small inhibiting RNA
NK	Natural killer	SMAD4	SMAD Family Member 4
NKT	Lymphocytes T Natural Killer	SMT3p	Suppressor of mif two temperature-sensitive mutant 3 protein
NO	Oxyde nitrique	snoRNP	Small nucleolar RiboNucleoProtein
NOS	Oxyde nitrique synthase	snRNP	Spliceosomal small nuclear RiboNucleoProtein
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	SOX2	SRY-Box transcription factor 2
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4	SP-RING	Siz / PIAS-RING
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	STAT	Signal Transducer and activator of transcription
PAX7	Paired-box 7	STING	Stimulator of interferon gene
PC2	Polycomb2	StUbl	SUMO-targeted ubiquitin ligase
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	SUMO	Small Ubiquitin-like modifier
PD-1	Programmed cell death 1	TAA	Tumor-associated antigen
PDE4	Phosphodiesterase 4	TAM	Tumor-associated macrophage
PD-L1	Programmed death-ligand 1	TBK1	TANK-Binding Kinase I
PDSM	Phosphorylation-dependent SUMOylation motif		

TCR	T cell receptor	UBC	Ubiquitin conjugating enzyme
TDG	Thymine DNA glycosylase	UBC9	Ubiquitin-conjugating Enzyme 9
TGF- β	Transforming growth factor β	UBD	Ubiquitin Binding Domain
Th1	T helper 1	UBE1L2	Ubiquitin-activating E1-Like protein 2
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocyte	UBL	Ubiquitin-like
TIM-3	T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3	UDP	Ubiquitin domain protein
TNF	Tumor Necrosis Factor	ULP1	Ubiquitin like protein 1
TOPOII α	Topoisomérase II α	ULP β	Ubiquitin like protein β
TOPORS	Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich	USP25	Ubiquitin-specific protease 25
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand	USPL1	Ubiquitin specific protease like 1
Treg	T régulateur	UV	Ultraviolet
TRIM38	Tripartite motif containing 38	VEGF	Vascular endothelial growth factor
Trm	T résident mémoire	VHB	Virus de l'hépatite B
UBA1	Ubiquitin-activating enzyme E1	VPH	Virus du papillome humain
UBA6	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	VSV	Vesicular stomatitis virus
		ZNF451	Zinc finger protein 451

Introduction générale

Depuis la découverte de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) par Friedrich Miescher un siècle et demi s'est écoulé (Dahm, 2005). Il aura pourtant fallu attendre Francis Crick en 1958 pour établir le dogme central de la biologie moléculaire et Gilbert en 1978 pour y ajouter un niveau supplémentaire de complexité par le mécanisme d'épissage de l'ARN (Crick, 1970; Gilbert, 1978). Depuis, nombre de découvertes ont été réalisées marquées par une accélération après la publication de la première version du séquençage humain en 2004 (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004).

Cependant, bien que posant les bases de la biologie moléculaire, le dogme central qui lie l'ADN à l'ARN (Acide ribonucléique) *via* la transcription, puis l'ARN aux protéines *via* la traduction sans aucun retour d'informations des acides aminés vers les acides nucléiques apparaît vite comme incomplet. La version popularisée de ce dogme par Watson en 1965 est encore plus stricte, affirmant qu'aucun retour en arrière n'est possible, même entre acides nucléiques (Watson, 1965). Les virus à ARN exposent les limites du modèle de la transmission de l'information par l'ADN, tout comme la découverte d'une transcriptase inverse dans le virus du sarcome de Rous. Dès 1956, des chercheurs travaillant sur le virus à mosaïque du tabac publient leurs constatations, démontrant ainsi que l'ARN peut être le support de l'information génétique (Fraenkel-Conrat, 1956; Gierer and Schramm, 1956). Par la suite, la caractérisation de la première transcriptase inverse identifiée permet de démontrer le possible retour d'informations de l'ARN à l'ADN (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). À partir de 1978, l'identification de séquence non-codante du génome permet, de fil en aiguille, la mise en lumière du mécanisme de l'épissage alternatif (Gilbert, 1978; Smith et al., 1989). Petit à petit, le modèle se complexifie et l'on admet que la séquence d'une protéine peut différer du codage initial présent sur la séquence de l'ADN et qu'une protéine peut elle-même modifier la séquence d'ADN ou subir des modifications que l'on va donc appeler « modifications post-traductionnelles » (Allfrey et al., 1964; Kim and Paik, 1965; Soffer, 1973).

Toutefois, c'est lorsque l'on commence à avoir accès au génome humain lors de la fin des années 1990 que l'on réalise l'ampleur des différents niveaux de diversifications ayant lieu depuis la séquence d'ADN. Le premier séquençage intégral du génome humain publié en 2004 révèle des chiffres surprenants : notre génome est composé d'environ 25 000 gènes au total, dont 21 000 gènes codant pour des protéines, ce qui est très peu étant donné la multitude de fonctions qu'elles assurent (*International Human Genome Sequencing Consortium, 2004*). À la suite de cela, le domaine de l'épigénétique initié par Conrad Waddington se développe avec l'idée que l'épigénétique formerait un pont entre le génotype et le phénotype par des mécanismes réversibles, transmissibles et adaptatifs de l'expression des gènes sans pour autant modifier la séquence de ces derniers (Goldberg et al., 2007). Ces nouveaux domaines attirent la curiosité scientifique et, associée aux grandes avancées dans les techniques de biologie moléculaire, mènent à une explosion du nombre de modifications post-traductionnelles identifiées (Eisenberg-Lerner et al., 2016). Le nombre de protéines qui composent le protéome humain reste encore inconnu à ce jour, mais il est estimé comme pouvant aller jusqu'à plusieurs millions du fait des différents niveaux de complexification existants (**Figure 1**).

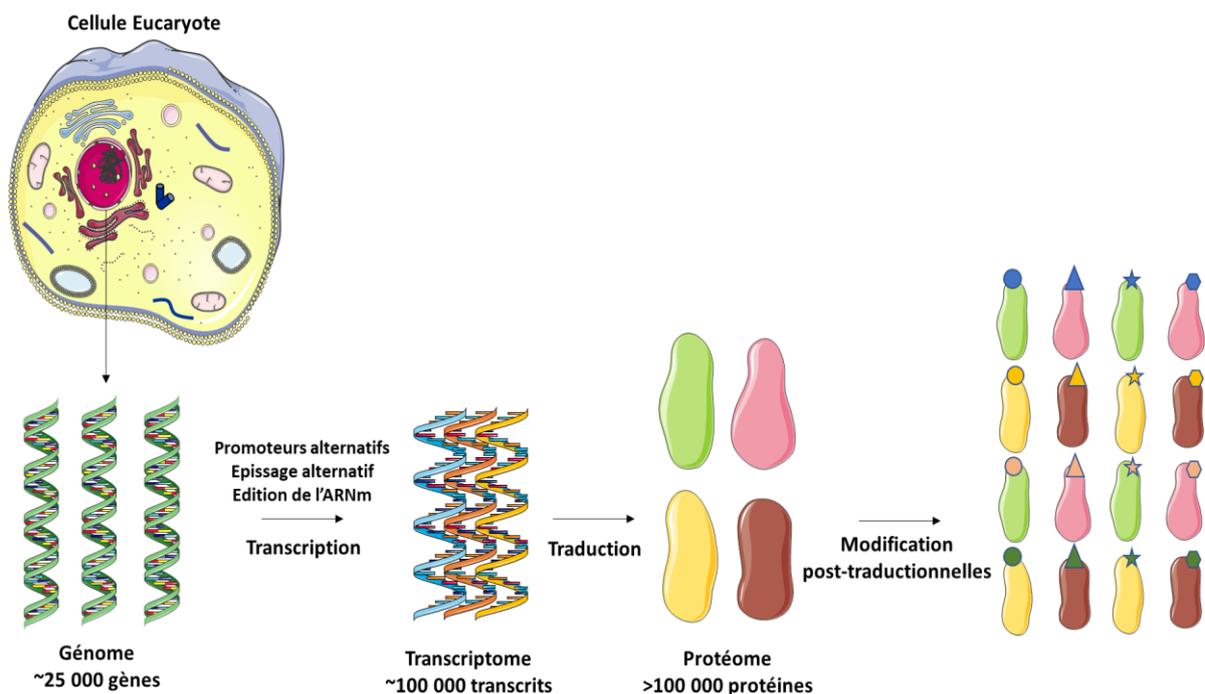


Figure 1 : Du génome au protéome.

Un premier niveau de complexification a lieu lors de la transcription, élargissant considérablement le contenu du transcriptome par rapport au génome. Les différentes modifications post-traductionnelles entraînent quant à elles une augmentation exponentielle du protéome, estimé au moins à 1 million de protéines. Adapté de *Virág et al., 2020*.

I. Les modifications post-traductionnelles

A. Diversité des modifications post-traductionnelles

La modification post-traductionnelle des protéines est l'un des mécanismes de régulation des protéines les plus importants chez les Eucaryotes, mais il existe aussi chez les Procaryotes. Ce mécanisme induit une grande diversification du protéome et par conséquent, permet aux différentes protéines ainsi formées d'assurer de nombreuses fonctions biologiques. On peut considérer qu'il existe deux grandes catégories de modifications post-traductionnelles : la première ajoute un groupement chimique ou un polypeptide de façon covalente sur la chaîne d'acides aminés et la deuxième clive une partie de la protéine d'origine par l'hydrolyse des liaisons peptidiques (**Figure 2**). Ces modifications sont diverses, elles ciblent 15 acides aminés sur les 21 connus chez les Eucaryotes, peuvent avoir lieu en divers points d'une même protéine au niveau d'un ou plusieurs acides aminés différents (Ribet and Cossart, 2010). En outre, il a été montré ces modifications pouvaient interagir entre elles au sein d'une protéine ou sur des protéines différentes, formant ainsi un réseau gigantesque de fonctions et de communications (Wu et al., 2019). De plus, la plupart de ces modifications sont réversibles grâce à l'action de nombreuses enzymes spécifiques. À ce jour, plus de 450 modifications post-traductionnelles ont été identifiées (*Consortium*, 2013), ce qui, additionné à leurs nombreuses possibilités de combinaison et à leur réversibilité, explique la grande diversité du protéome.

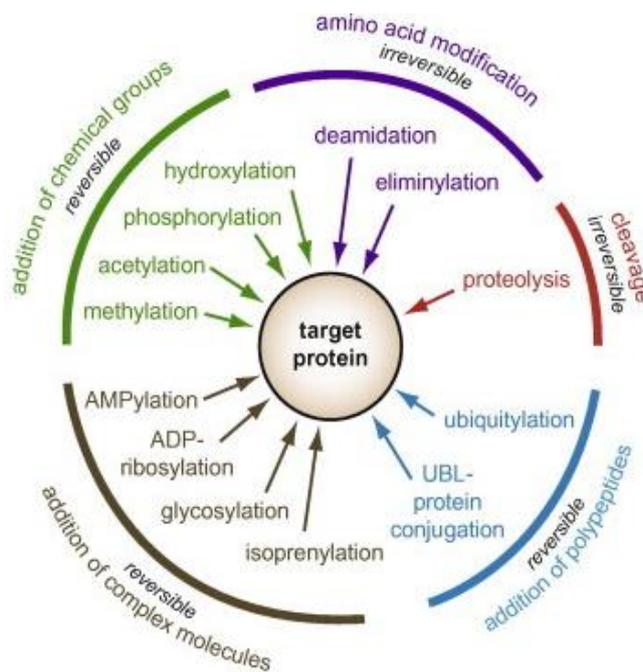


Figure 2 : Diversité des modifications post-traductionnelles.

Il existe plusieurs types de modifications de protéines : les modifications réversibles par addition d'un groupement chimique, de polypeptides, ou de molécules complexes, ou les modifications irréversibles par clivage du lien peptidique ou soustraction de groupements chimiques d'un acide aminé. D'après Ribet and Cossart, 2010.

De nombreuses modifications post-traductionnelles continuent d'être décelées et caractérisées, nous allons ici nous intéresser plus particulièrement à l'une d'entre elles, essentielle et pourtant encore méconnue sur bien des aspects : la SUMOylation.

Mais avant cela, afin de mieux appréhender la SUMOylation, il convient de comprendre le mécanisme d'action d'une modification beaucoup plus connue et étudiée qu'est l'ubiquitination. En effet, comme son nom l'indique, SUMO (« *Small Ubiquitin-like modifier* ») est une protéine « *Ubiquitin-like* » et fonctionne donc de manière similaire, en se conjuguant covalamment à une autre protéine.

B. L'ubiquitination

L'Ubiquitine est la première modification post-traductionnelle jamais identifiée, et une des plus connues. Elle a été initialement purifiée par Goldstein en 1975 mais ce sont les travaux d'Hershko, de Ciechanover et de Rose qui ont permis de caractériser la complexe cascade enzymatique qui donne lieu à sa conjugaison (Goldstein et al., 1975; Hershko et al., 1981; Ciechanover et al., 1980). Ils démontrèrent que la poly-ubiquitination des protéines entraîne leur dégradation par le protéasome, et obtinrent pour cela le prix Nobel de chimie en 2004.

L'Ubiquitine tient son nom du fait qu'elle est présente dans toutes les cellules de l'organisme et il devient très vite évident qu'elle est impliquée dans tous les aspects de la

biologie cellulaire. Il s'agit d'un petit peptide très conservé de 76 acides aminés (8,5 kDa) dont la structure secondaire lui confère une forme globulaire compacte. Elle possède 7 résidus lysines qui lui sont essentiels pour créer les chaînes d'Ubiquitine (Brooks, 2010).

L'Ubiquitine est attachée *via* son résidu glycine C-terminal au groupe ϵ -aminé d'un résidu lysine du substrat. Cette réaction est réalisée lors d'une cascade enzymatique qui comporte plusieurs grandes étapes (Kerscher et al., 2006):

- Lors de la première étape, l'Ubiquitine acquiert sa forme mature par l'action de déubiquitinases (DUBs) qui clivent le domaine C-terminal de la protéine, permettant ainsi l'exposition d'un résidu glycine.
- Puis, l'Ubiquitine est activée de façon ATP-dépendante par une enzyme E1 qui va créer une liaison thioester de haute énergie entre la glycine de la forme mature et un de ses résidus cystéine interne. Il n'existe à ce jour chez les Mammifères que deux enzymes E1 caractérisées, Uba1 (« *Ubiquitin-activating enzyme E1* ») et Ube1 (« *Ubiquitin-activating E1-Like protein 2* ») (Pelzer et al., 2007).
- La troisième étape correspond à la conjugaison de l'Ubiquitine qui est transférée sur une enzyme E2 Ubc (« *Ubiquitin conjugating enzyme* ») avec laquelle elle forme également une liaison thioester. On connaît actuellement plus d'une trentaine d'enzyme E2 codées par le génome humain.
- Finalement, une étape de ligation est catalysée par des enzymes E3 qui vont créer une liaison isopeptidique entre la lysine de la protéine cible et la glycine C-terminale de l'Ubiquitine. Plusieurs centaines d'enzyme E3 ont été identifiées, elles sont donc en grande partie responsables de la spécificité de substrat de l'ubiquitination.

L'ubiquitination est réversible grâce aux DUBs qui, en plus d'assurer la maturation des précurseurs d'Ubiquitine, permettent également le clivage du peptide de ses substrats et son recyclage.

Les protéines peuvent être modifiées au niveau d'un ou de plusieurs résidus de lysine par une seule molécule d'Ubiquitine, on parle alors respectivement de mono- et multi-ubiquitination, ou bien par des polymères d'Ubiquitine (poly-ubiquitination). Au sein d'une de ces chaînes, les possibilités d'assemblages sont multiples. Chaque Ubiquitine peut être conjuguée au niveau de l'un de ses sept résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K68) et de son résidu méthionine N-terminal (M1). De plus, ces chaînes peuvent également être ramifiées étant donné qu'une molécule d'Ubiquitine peut être ubiquitinée sur plusieurs sites. La

diversité de signalisation par cette protéine est encore amplifiée par la possible communication entre l'ubiquitination et d'autres modifications post-traductionnelles (**Figure 3**) (Brooks, 2010).

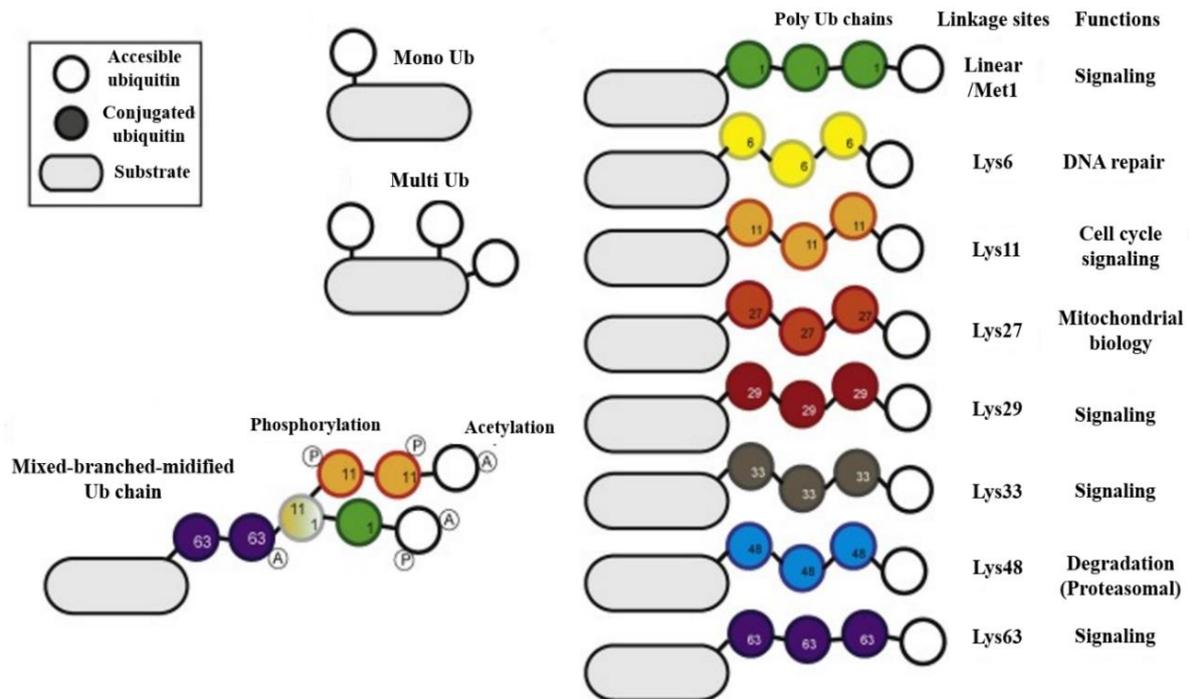


Figure 3 : Différents types d'ubiquitination et fonctions associées.

Un substrat peut être mono-ubiquitiné, multi-ubiquitiné et/ou poly-ubiquitiné. Huit résidus de l'Ubiquitine peuvent être utilisés comme base pour la formation des chaînes de poly-ubiquitine : K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 et Met. Les chaînes ainsi formées peuvent être soumises à d'autres modifications post-traductionnelles. Cette variabilité permet d'attribuer différentes fonctions cellulaires aux substrats modifiés. Le destin associé au substrat va donc dépendre du type de chaîne. Par exemple, une protéine poly-ubiquitinée *via* la lysine 48 est destinée à être dégradée par le protéasome. Adapté de Gómez-Díaz and Ikeda, 2019.

Il existe donc de nombreux types de chaînes selon le résidu lysine sur lequel elles se forment et chacune de ces chaînes à une fonction distincte. La mono-ubiquitination d'une protéine est ainsi impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose et la transcription (Hicke, 2001; Weake and Workman, 2008), tandis que la poly-ubiquitination via la lysine 48 destine le substrat à la dégradation si la chaîne comprend plus de quatre Ubiquitines (**Figure 3**) (Brooks, 2010). Les chaînes formées à partir de la lysine 6 seraient quant à elles impliquées dans la réparation de l'ADN et l'homéostasie de la mitochondrie (Swatek and Komander, 2016). Les interactions entre l'ubiquitination et les autres modifications post-traductionnelles ajoutent encore au vaste réseau de signalisation de cette protéine. On sait par

exemple que la SUMOylation de l'Ubiquitine au niveau des lysines K6 et K27 est augmentée en réponse au choc thermique et à l'inhibition du protéasome (Hendriks et al., 2014).

Une autre conséquence de l'ubiquitination est l'ajout d'une nouvelle surface sur la protéine cible qui lui permet d'interagir avec de nouveaux partenaires. En effet, certaines protéines possèdent des domaines d'interaction avec l'ubiquitine appelés UBDs (« *Ubiquitin binding domains* »). Par exemple, les protéines Rpn1, Rpn10 et Rpn13 qui composent la sous-unité 19S du protéasome possèdent des UBDs spécifiques pour les chaînes d'ubiquitine K48, permettant ainsi de cibler les substrats destinés à être dégradés (Husnjak et al., 2008; Shi et al., 2016).

Comme on vient de le voir, l'ubiquitination est un mécanisme difficile à appréhender par son implication dans de nombreux mécanismes cellulaires et la multiplicité des formes qu'elle peut prendre. On comprend donc pourquoi un dysfonctionnement de la signalisation médiée par l'Ubiquitine peut entraîner des conséquences dramatiques. Ainsi, l'ubiquitination est impliquée dans de nombreuses pathologies humaines telles que le cancer et les maladies inflammatoires (Komander, 2009).

C. Les protéines « Ubiquitine-like »

Depuis les années 1990, faisant suite à la découverte de l'Ubiquitine, plusieurs familles de protéines ont été identifiées comme étant apparentées à cette dernière. Elles peuvent être classées en 2 groupes distincts (Jentsch and Pyrowolakis, 2000) :

Le premier est constitué de protéines à multi-domaines, qui possèdent un domaine Ubiquitine ou UDP (« *Ubiquitin domain protein* ») leur permettant pour la plupart d'interagir directement avec le protéasome. Ces protéines ne possèdent pas de motif glycine C-terminal et ne peuvent donc pas être conjuguées à un substrat. On peut citer notamment la Parkine qui est impliquée dans la maladie de Parkinson (Gladkova et al., 2018).

Les protéines du second groupe fonctionnent de manière similaire à l'Ubiquitine. Bien que ne présentant pas tous une forte homologie de séquence avec cette dernière, ces protéines partagent une structure tridimensionnelle similaire, avec une forme globulaire en feuillets β et un motif di-glycine C-terminal qui permettent leur activation et leur liaison covalente aux substrats *via* la cascade enzymatique E1 – E2 – E3. Ces protéines sont maintenant appelées

« UBLs », un acronyme pour « *Ubiquitin-like* ». La première protéine UBL est identifiée vers la fin des années 1980 (Loeb and Haas, 1994). Il s'agit d'Isg15 (« *Interferon stimulated gene 15* ») qui ressemble à un dimère d'Ubiquitine, dont le gène *Isg15* est induit en réponse aux interférons de type I (IFN-I) et qui possède un rôle crucial dans la réponse antivirale. Depuis, une vingtaine d'UBLs ont été identifiées, elles sont regroupées dans le **Tableau 1**. Parmi celles-ci nous nous intéresserons à la famille des protéines SUMOs.

UBLs	ID (%)	E1	E2	E3	Protéases	Substrats	Fonctions
Ubiquitine	100	Ube1/ Uba6	>37	>600	~80	Des centaines	Multiples, dépendantes du type de liaison
Nedd8	58	Nae1-Uba3	Ubec12 Ube2F	~10	Csn5, Nedp1	Cullines, suppresseurs de tumeurs, oncoprotéines	Régulation de l'ubiquitination, cycle cellulaire
NSF (« <i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i> ») (Fub1, Fau)	36					Protéines TCR-like; Bcl-G, Endophilin II	Régulation de l'immunité
Isg15	28/37	Ube1L	UbcH8, UbcH6	Herc5	Ubp43	Protéines virales et de l'hôte	Immunité antivirale, inductible par l'interféron
Fat10	27/36	Uba6	Uba6	Use2		Use2	Dégradation par le protéasome indépendante de l'Ubiquitine, régulation de l'immunité
Ufm1	23	Uba5	Ufc1	Ufl1	UfSP1, UfSP2	C20orf116	Développement des érythrocytes et des mégacaryocytes
SUMO-1 SUMO-2 SUMO-3 SUMO-4	14 13 13 12	Sae1-Sae2	Ubc9	~20	Senp1-3, Senp5-7 Desl1-2 Usp11	Des milliers	Altère l'interaction, la localisation, la conformation des protéines
Atg12	12	Atg7	Atg10			Atg5, Atg3	Autophagie, homéostasie mitochondriale
URM1	17	Mocs3					Thiolation des tARN
MAP1LC3A	9	Atg7	Atg3	Atg12, Atg5, Atg16l	Atg4A-d	« <i>Phosphatidylethanolamine</i> » (PE)	Formation des autophagosomes, autophagie sélective par interaction avec les récepteurs de l'autophagie
MAP1LC3B	13						
MAP1LC3C	10						
GABARAP	8						
GABARAPL1	12						
GABARAPL2	14						

Tableau 1 : Liste des protéines « *ubiquitine-like* » connues chez les Mammifères.

Les cascades enzymatiques ainsi que certains substrats et fonctions des UBLs sont indiqués.

ID = conservation avec l'Ubiquitine. Adapté de *van der Veen and Ploegh, 2012*.

II. La SUMOylation

A. Généralités sur SUMO

La découverte de la famille des protéines SUMOs n'a eu lieu que vers la moitié des années 1990 de manière concomitante par plusieurs équipes de recherche. L'intérêt que suscite le domaine de la SUMOylation est exacerbé par les 20 ans de travaux antérieurement réalisés sur l'Ubiquitine, ce qui permet une rapide avancée dans la caractérisation de cette protéine. Il apparaît vite que les protéines SUMO jouent un rôle essentiel dans la cellule, à l'instar de l'Ubiquitine. Les premiers travaux concernant les protéines SUMO sont publiés en 1995 et concernent à l'origine Mif2 (« *Mitotic fidelity of chromosome transmission protein 2* »), une protéine impliquée dans la ségrégation des chromosomes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Meluh and Koshland, 1995). Dans cette étude, des supprimeurs du phénotype de la mutation de Mif2 sont identifiés lors d'un crible génétique, dont le gène *Smt3p* (« *Suppressor of mif two temperature-sensitive mutant 3 protein* ») qui code pour ce que nous savons maintenant être l'orthologue chez la Levure du SUMO-1 humain. L'année suivante, le gène humain *Sumo1* fut cloné sous le nom de *hSmt3* lors de trois études différentes impliquant des cribles double-hybrides. La première étude montre l'interaction de SUMO-1 avec la protéine PML (« *Promyelocytic leukemia* ») ce qui lui vaut l'appellation Pic1 (« *PML-interacting clone 1* ») (Boddy et al., 1996). Les deux cribles suivants l'identifient sous deux autres noms comme partenaire de Rad51 et Rad5, impliqués dans la réparation de l'ADN, ainsi que de FAS et TNF (« *Tumor Necrosis Factor* »), impliqués dans l'apoptose (Shen et al., 1996; Okura et al., 1996). Peu de temps après, deux études indépendantes établissent pour la première fois la liaison de *Stm3* de façon covalente, ATP-dépendante et réversible à la protéine RanGAP1 (« *RAN GTPase-activating protein 1* ») et le nom de SUMO-1 est introduit pour la première fois (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). Au fil du temps, c'est finalement la terminologie SUMO qui a été retenue pour cette famille de protéines.

Les protéines SUMOs sont exprimées et conservées chez tous les Eucaryotes, depuis la Levure jusqu'aux cellules des Mammifères, bien que le nombre d'isoformes changent d'un organisme à un autre. Ainsi, les êtres unicellulaires comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* et les invertébrés comme *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans* ne possèdent qu'un seul gène SUMO tandis que les organismes plus complexes comme les plantes et les vertébrés en possèdent plusieurs. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 8 gènes

codant pour des paralogues de SUMO, alors que celui de la plupart des Vertébrés comme *Mus musculus* en contient trois exprimés de manière ubiquitaire (*Sumo-1*, *Sumo-2* et *Sumo-3*) (Hay, 2005; Wilson, 2017). Un quatrième paralogue est connu chez l'Homme (*Sumo-4*) dont l'expression est limitée à un nombre restreint de tissus : reins, ganglions lymphatiques, testicules et possiblement placenta (Bohren et al., 2004). Bien que beaucoup moins étudié que les trois autres paralogues, il semblerait que SUMO-4 soit impliqué dans la réponse au stress intracellulaire et le diabète (Guo et al., 2004; Wei et al., 2008).

Les protéines SUMOs sont des petits peptides contenant 101 acides aminés et d'un poids moléculaire de 11.6 kDa. SUMO-2 et SUMO-3 sont identiques à 97%, ce qui explique qu'ils ne peuvent être différenciés par un anticorps. En revanche, ils ne partagent que 50% d'identité avec SUMO-1 (Gareau and Lima, 2010). C'est la raison pour laquelle on différencie en général SUMO-1 de ses deux autres isoformes, mais sans faire la distinction entre SUMO-2 et 3 qu'on appelle SUMO-2/3. SUMO-4 partage quant à lui 87% d'identité avec SUMO-2 (**Figure 4**). De plus, les protéines SUMO sont très conservées entre les différentes espèces. Un des exemples le plus parlant est l'alignement des séquences protéiques de SUMO-1 chez l'Homme et chez la Souris qui présentent 100% d'identité.

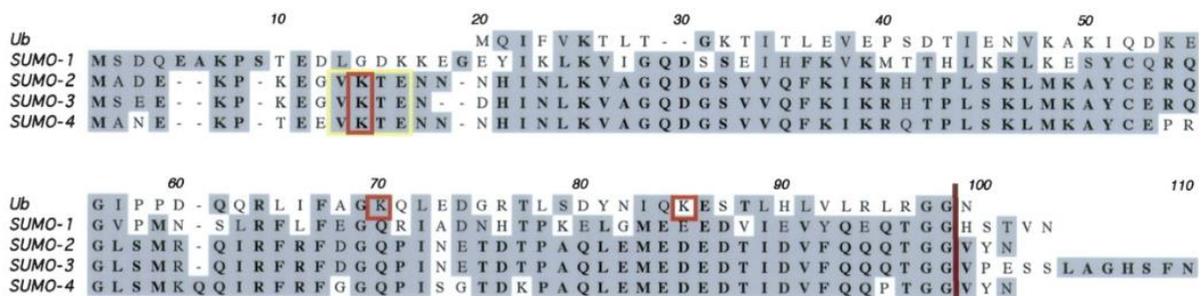


Figure 4 : Alignements des séquences protéiques de l'Ubiquitine et des quatre paralogues de SUMO chez l'Homme.

Les acides aminés identiques sont indiqués en gras et ceux qui présentent des similitudes sont en gris. Le cadre jaune indique un motif consensus SUMO et les cadres rouges les lysines acceptrices. La barre rouge indique le site de clivage après le résidu di-glycine C-terminal qui permet la production de protéines matures à partir des précurseurs. De Gill, 2004.

Comme on peut le voir sur la **figure 4**, les protéines SUMO ne présentent que 18% d'homologie de séquence avec l'Ubiquitine mais elles partagent toutefois une structure tri-dimensionnelle très similaire avec une structure globulaire compacte de type $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ et un motif di-glycine C-terminal. La principale différence entre les protéines SUMOs et l'Ubiquitine réside dans le long et flexible domaine N-terminale de la protéine qui n'est pas présente chez cette dernière (**Figure 5**). Une autre différence importante est la répartition des charges en surface qui expliquerait leur spécificité de substrats (Dohmen, 2004).

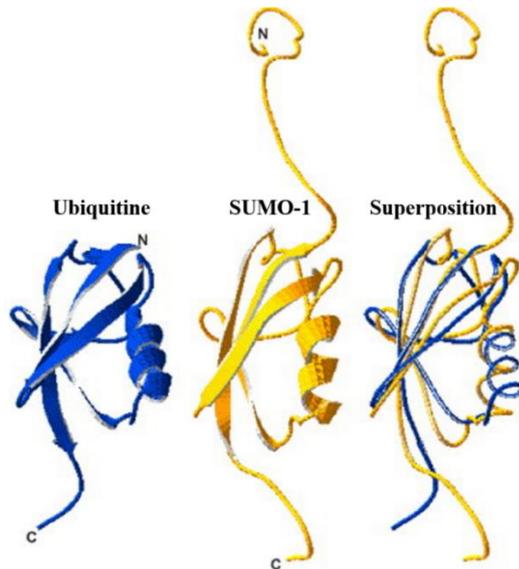


Figure 5 : Comparaison de la structure de l'Ubiquitine et de SUMO-1.

Les deux protéines partagent une structure tri-dimensionnelle très similaire avec une structure globulaire compacte $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ et un motif di-glycine C-terminal. *Dohmen, 2004.*

Hisato Saitoh et Joseph Hinchey sont les premiers à avoir rapportés des différences fonctionnelles entre SUMO-1 et SUMO-2/3 lors d'une étude portant sur la SUMOylation par SUMO-2/3 endogène. Ils montrent alors que SUMO-2/3 est présent en plus grande abondance que SUMO-1 dans la cellule et principalement sous forme non conjuguée, mais aussi que les différents isoformes ne partagent pas forcément les mêmes substrats (avec ici l'exemple de RanGAP1 conjugués uniquement par SUMO-1) ni les mêmes localisations et que lors d'un stress environnemental tel qu'un choc thermique, SUMO-2/3 libre est principalement recruté (Saitoh and Hinchey, 2000). Différentes études ont depuis validé ces résultats et décrivent plus en détail ces différences. Ainsi, en condition physiologique, SUMO-1 est constitutivement conjugué à ces substrats tandis que SUMO-2/3 est présent majoritairement sous sa forme libre, et se conjugue lors d'un stress cellulaire. Si certains substrats sont exclusivement modifiés par un seul isoforme, d'autres peuvent l'être à la fois par SUMO-1 et par SUMO-2/3, tels que la protéine PLM. De plus, bien que les protéines SUMOs soient majoritairement nucléaires, SUMO-1 se situe préférentiellement dans les enveloppes nucléaires et les structures

cytoplasmiques tandis que SUMO-2/3 se localise au niveau du nucléoplasme et lors de la télophase, au niveau du chromosome (Ayaydin and Dasso, 2004).

Comme l'Ubiquitine, SUMO peut être conjugué en tant que monomère sur un ou plusieurs sites d'une protéine cible. De même, SUMO-2/3 a la capacité de former des chaînes polymérisées principalement *via* la lysine 11 présente au niveau de son extension N-terminale mais aussi *via* d'autres résidus comme les lysines 7 et 21 (Gärtner et al., 2018). SUMO-1 est dépourvu de ces lysines et ne peut donc pas former de chaînes polymérisées, ce qui constitue une des différences majeures entre SUMO-1 et SUMO-2/3 et pourrait expliquer en grande partie leurs fonctions distinctes (Tatham et al., 2001).

Malgré cette hétérogénéité fonctionnelle et biochimique des différents paralogues SUMOs, il apparaît que ces derniers n'ont pas tous un rôle essentiel, du moins chez la Souris. En effet, la déplétion de SUMO-2 est létale chez *Mus musculus* au contraire de celle de SUMO-1 ou de SUMO-3 où l'on observe un développement embryonnaire normal (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2008). SUMO-2/3 est donc capable de compenser la perte de SUMO-1 mais la réciproque n'est pas vraie ce qui indique que la formation de chaînes poly-SUMO est essentielle au développement de l'organisme. De plus, SUMO-2 étant la forme majoritairement exprimée au cours du développement, cela expliquerait pourquoi les mutants SUMO-3 sont viables et non les mutants SUMO-2.

De manière générale, la SUMOylation s'avère essentielle dans la plupart des espèces. De nombreuses études portant sur Ubc9 (« *Ubiquitin-conjugating Enzyme 9* ») -l'unique enzyme de conjugaison SUMO dont la perte abroge totalement la SUMOylation, montrent que sa délétion entraîne des conséquences sévères voire une létalité embryonnaire. Chez *C. elegans* par exemple, un RNAi (« *Ribonucleic acid interference* ») Ubc9 entraîne de graves défauts de développement et un arrêt embryonnaire après la gastrulation (Jones et al., 2001). Chez la Drosophile, une dérégulation de cette voie en ciblant différentes enzymes du cycle SUMO mène également à des défauts de développement. Encore plus drastiques, les modèles de mutants pour les désSUMOylases Senp1 et Senp2 (« *Sentrin-specific protease 1/2* ») ainsi que la E3 ligase Pias1 (« *Protein inhibitor of activated STAT1* ») entraînent une létalité à l'état embryonnaire chez la Souris. Une surexpression de la SUMOylation est également délétère ce qui indique l'importance d'une régulation fine de la voie SUMO (Deyrieux and Wilson, 2017). Les modèles utilisés pour étudier la SUMOylation doivent donc être adaptés en conséquence, en particulier

pour les modèles *in vivo*. Nous présenterons par la suite certains modèles cellulaires et murins utilisés par le laboratoire.

B. Le processus enzymatique de la SUMOylation

Le processus enzymatique de la SUMOylation d'une protéine est similaire à celui de l'ubiquitination. On retrouve les différentes étapes de maturation, activation, conjugaison, ligation et clivage mais les enzymes impliquées dans ces réactions sont propres à la voie SUMO (**Figure 6**).

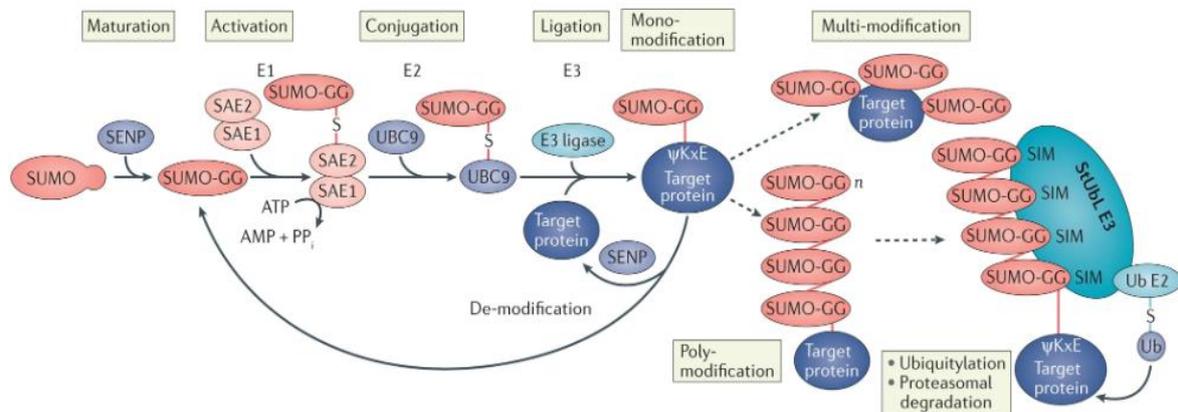


Figure 6 : La cascade de SUMOylation.

Les précurseurs SUMO sont d'abord clivés par des SUMO protéases SENP exposant ainsi le motif di-glycine carboxy-terminal (maturation). Puis SUMO forme un intermédiaire thioester avec l'enzyme E1 hétérodimérique Sae1-Sae2 (« *SUMO-activating enzyme subunit 1/2* ») de façon ATP dépendante (activation). SUMO est ensuite transféré à l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9 (conjugaison) avant d'être conjugué, via une liaison isopeptidique à un résidu lysine du substrat (ligation). Cette dernière étape nécessite généralement une SUMO E3 ligase ou des facteurs de type ligase canoniques ou non canoniques. Les substrats peuvent être multi- et / ou poly-sumoylés. Les protéines conjuguées peuvent par la suite interagir avec les protéines possédant des SIMs (« *SUMO interacting motifs* ») telles que les StUbLs (« *SUMO-targeted ubiquitin ligases* »), ce qui conduit à une ubiquitination du substrat et à sa dégradation par le protéasome. La SUMOylation est réversible grâce à l'action des SENPs ce qui en fait une modification transitoire et dynamique. *Seeler and Dejean, 2017.*

1. Maturation et déSUMOylation

Les protéines SUMO sont synthétisées sous forme de précurseurs immatures dont le motif di-Glycine en C-terminal est suivi par une séquence variable de 2 à 11 acides aminés. La maturation de ces précurseurs est indispensable à la suite du cycle de SUMOylation car elle permet d'exposer les résidus glycines nécessaires à la conjugaison. Cette étape est réalisée par les hydrolases de la SUMOylation qui sont également impliquées dans la déSUMOylation des substrats. La déconjugaison et le recyclage de protéines SUMO précédemment conjuguées permet de fournir une nouvelle source de SUMO conjugable.

Chez la Levure, deux protéases sont capables de maturer le précurseur Smt3 et de cliver sa liaison isopeptidique avec le substrat. Il s'agit d'Ulp1 et Ulp β (« *Ubiquitin like protein 1/ β* ») qui sont également les premières protéases SUMO spécifiques caractérisées (Li and Hochstrasser, 1999). Il existe à ce jour trois grandes familles de déSUMOylases identifiées chez les Mammifères : les Senps, Desi1 et 2 (« *Desumoylating isopeptidase 1/2* »), et Uspl1 (« *Ubiquitin specific protease like 1* »). La famille la mieux caractérisée est celle des SENPs qui comporte six membres (Senp1 -2 -3 -5 -6 et -7). Chaque SENP présente une localisation, une activité et des substrats spécifiques. Elles présentent toutes une activité isopeptidase (de déSUMOylation) mais seulement Senp1, -2 et -5 ont été décrites comme capables de cliver les précurseurs de SUMO et seuls les Senp6 et -7 peuvent éditer les chaînes SUMO, tandis que Senp1 peut uniquement modifier la longueur des chaînes SUMO-2/3 en enlevant le SUMO-1 qui termine la chaîne polymérique (Hickey et al., 2012; Huang et al., 2015).

Les deux autres classes de déSUMOylases Desi et Uspl ont été identifiées plus récemment car elles partagent peu de similitudes de séquence avec les SENPs. Desi-1 est localisée de manière diffuse dans tout le cytoplasme et le noyau, et sa spécificité de substrat est distincte de celle des SENPs puisque son seul substrat actuellement connu est Bzel (« *BTB-ZF protein expressed in effector lymphocytes* »). Par ailleurs, il a été montré que la déplétion de Desi-1 dans les cellules HEK293T ne modifie pas de manière détectable les profils de SUMO conjugués, ce qui suggère que Desi-1 a un nombre limité de substrats (Shin et al., 2012). Desi-2 étant très similaire à la déSUMOylase Desi-1 et se concentrant également dans le cytoplasme, pourrait compenser partiellement la perte de cette dernière.

Uspl1, qui constitue à lui seul la dernière classe de déSUMOylases, se localise dans les corps de Cajal, des structures nucléaires associées à la biogenèse des snRNPs (« *spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins* ») et des snoRNPs (« *small nucleolar ribonucleoproteins* »),

la maintenance des télomères et le traitement des ARNm des histones. Bien qu'aucun substrat de la protéase Usp11 n'ait encore été détecté à ce jour, il semble qu'elle ait un rôle dans les processus mentionnés ci-dessus (Hutten et al., 2014).

Les propriétés principales de ces déSUMOylases sont présentées dans le **Tableau 2**.

Protéases	Variants ARNm	Localisation	Activité Endopeptidase	Activité Isopeptidase	Spécificité de substrat	Editions des chaînes
Ulp1	1	Pore nucléaire	Oui	Oui	Smt3	Non
Ulp2	1	Nucléoplasme	Non	Oui	Smt3	Oui
Snp1	2	Pore nucléaire	Oui	Oui	SUMO-1 SUMO-2/3	Oui
		Foci nucléaire				
Snp2	3	Pore nucléaire	Oui	Oui	SUMO-1 SUMO-2/3	Non
		Foci nucléaire				
		Cytoplasme				
Snp3	2	Nucléole	Inconnu	Oui	SUMO-2/3	Non
		Nucléoplasme				
Snp5	1	Nucléole	Oui	Oui	SUMO-2/3	Non
		Mitochondrie				
Snp6	1	Nucléoplasme	Non	Oui	SUMO-2/3	Oui
Snp7	1	Nucléoplasme	Non	Oui	SUMO-2/3	Oui
Desi-1	1	Noyau	Limitée	Oui	SUMO-1 SUMO-2/3	Oui
		Cytoplasme				
Desi-2	1	Cytoplasme	Non	Inconnu	Inconnu	Inconnu
Usp11	1	Corps de Cajal	Limitée	Oui	SUMO-2/3 > SUMO-1	Oui

Tableau 2 : Propriétés des différentes déSUMOylases.

Les lignes encadrées en gras correspondent aux protéases présentes chez la Levure. Les autres déSUMOylases sont présentes chez les Mammifères. Adapté de *Huang et al., 2015*.

2. Activation de SUMO 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. Cette enzyme est unique et spécifique à la SUMOylation, elle est constituée d'un hétérodimère de deux protéines Sae1 et Sae2 qui présentent des similitudes de séquence avec les parties N et C terminales, respectivement, des enzymes activant l'Ubiquitine. La formation de la liaison thioester entre SUMO et l'enzyme E1 se fait en 2 étapes. Sae1 catalyse l'adénylation ATP-dépendante de la

Glycine C-terminale de SUMO, tandis que Sae2 porte la cystéine catalytique avec laquelle SUMO va ensuite former une liaison thioester de haute énergie, libérant l'AMP (Adénosine monophosphate) (Dohmen, 2004).

3. Conjugaison de SUMO par l'enzyme E2

Lors d'une réaction de transestérification, le SUMO activé est ensuite transféré de la sous-unité Sae2 à la cystéine catalytique d'Ubc9, l'unique enzyme E2 SUMO connu chez les Mammifères. Il s'agit de l'étape de conjugaison. Comme l'enzyme E1 activatrice de SUMO, Ubc9 est une protéine principalement nucléaire, mais on la retrouve aussi au niveau du pore nucléaire et dans le cytoplasme.

Ubc9 est très bien conservée chez tous les Eucaryotes, ainsi les orthologues chez l'Homme (nom de gène *Ube2i*) et la Souris partagent 100% d'identité, et on retrouve 56% d'identité entre les orthologues de *S. cerevisiae* et de l'Homme (Kovalenko et al., 1996). Étant donnée la fonction essentielle d'Ubc9 dans la voie SUMO et de sa conservation inter-espèce, il n'est donc pas surprenant qu'une déplétion de cette enzyme soit létale chez la plupart des Eucaryotes. Par exemple, une déficience en Ubc9 chez les Souris entraîne une létalité embryonnaire précoce au cours du développement (Nacerddine et al., 2005).

4. Ligation de SUMO par les enzymes ligases E3

Lors de la dernière étape, les ligases E3 catalysent le transfert de SUMO de l'enzyme Ubc9 vers la lysine acceptrice de la protéine cible. Les ligases interagissent avec le complexe Ubc9-SUMO et le substrat pour les rapprocher. Les enzymes E3 ne forment pas d'intermédiaire covalent avec SUMO ou son substrat, contrairement à l'Ubiquitine. Cette étape pourrait donc être réalisée sans l'aide des E3 ligases, mais leur action apporte une spécificité de substrat et facilite cette réaction. En effet, elles orientent SUMO de manière optimale pour que l'attaque nucléophile par la lysine acceptrice du substrat puisse avoir lieu (Pichler et al., 2017).

Un grand nombre d'enzymes ont à ce jour été identifiées comme des SUMO E3 ligases, elles sont divisées en trois classes : la famille SP-RING (« *Siz* / *PIAS-RING* »), RanBP2 (« *RAN binding protein 2* ») et la famille ZNF451 (« *Zinc finger protein 451* »).

La plus grande et la première famille découverte de SUMO E3 ligases est celle des SP-RING qui se caractérise par la présence d'un domaine RING (« *Really Interesting New Gene* »), une structure en doigt de zinc impliquée dans la médiation des interactions protéine-protéine, apparentée à celle de certaines Ubiquitine E3 ligases et indispensable à leur fonction. Les premiers membres identifiés étaient Siz1 et Siz2 chez *S. cerevisiae* dont le domaine SP-RING est très conservé de la Levure à l'Homme (Johnson and Gupta, 2001). C'est pourquoi, peu de temps après, la fonction de SUMO E3 ligase fut démontrée pour des homologues chez les Mammifères, les protéines PIASs qui avaient initialement été décrites comme des inhibiteurs de la voie de signalisation JAK-STAT (« *Signal Transducer and activator of transcription* ») (Chung et al., 1997). Elles sont codées par quatre gènes chez l'Homme comme chez la Souris (Pias1, -2, -3 et -4/Piasy) chacun capable de produire plusieurs isoformes. Tous les membres de la famille PIAS partagent également un domaine SAP (A/B/acinus/PIAS) de liaison à l'ADN, un motif PINIT (Pro-Ile-Asn-Ile-Thr) qui contribue à la spécificité de substrat et un motif de reconnaissance de SUMO (SIM : « *SUMO interacting motif* ») qui leur permet d'interagir directement avec SUMO. Les phénotypes observés chez les Souris invalidées pour les PIASs sont modérés à l'exception de Pias1 qui est essentielle, ce qui suggère que leurs fonctions pourraient être redondantes (Constanzo et al., 2016). D'ailleurs, la double invalidation *Pias1*^{-/-} et *Piasy*^{-/-} entraîne une létalité embryonnaire avant 11,5 jours de développement (Tahk et al., 2007).

Les protéines PIASs ne se limitent pas à leur seule activité de ligase, elles semblent en outre influencer l'activité des facteurs de transcription par divers mécanismes tel que l'inhibition de leur liaison à l'ADN, le recrutement d'histones désacétylases (HDAC), ou bien encore leur séquestration dans les corps nucléaires (Dohmen, 2004). A l'échelle de l'organisme, les PIASs sont entre autre impliquées dans le développement embryonnaire, l'hématopoïèse, la réponse immunitaire innée et adaptative, la mémoire à long terme et le cancer (Rabellino et al., 2017).

La deuxième famille de SUMO ligases n'est constituée que de la protéine RanBP2. Il s'agit d'une nucléoporine de 358 kDa présente au niveau du pore nucléaire dans les cellules en interphase, et au niveau des kinétochores et du fuseau mitotique dans les cellules en mitose. Elle possède donc des fonctions clés dans le transport nucléaire et la mitose. Lors de la mitose, une petite fraction de la protéine RanBP2 forme un complexe avec RanGAP1 SUMOylé, leur interaction protège RanGAP1 des désSUMOylases. La déplétion de RanBP2 chez la souris est létale dès le stade embryonnaire tandis qu'une simple réduction de ses niveaux d'expression

entraîne une aneuploïdie sévère due à des défauts de ségrégation chromosomique (Aslanukov et al., 2006; Dawlaty et al., 2008). Seulement quelques substrats ont été identifiés pour RanBP2 notamment la TOPOII α (Topoisomérase II α) dont l'inhibition induit le même type de phénotype.

La dernière famille, celle des ZNF451, n'a été découverte que récemment et présente une spécificité importante pour les paralogues SUMO-2/3. Elle est donc dédiée à l'extension des chaînes poly-SUMO, à priori lors d'un stress cellulaire et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Cette famille est encore peu caractérisée mais on sait que le locus du gène *Znf451* humain code pour trois isoformes partageant toutes un motif SIM en tandem : Znf451-1, -2, -3, et que Znf451-1 semble coopérer avec Rnf4 (« *Ring finger protein 4* ») pour réguler les niveaux de PML endogène (Anamika and Spyrapoulos, 2016; Pichler et al., 2017).

Il existe d'autres SUMO E3 ligases, parmi lesquelles on peut citer la protéine Polycomb2 (Pc2), certaines HDAC, TOPORS (« *Topoisomerase I binding, arginine/serine-rich* ») qui a la particularité d'être à la fois une Ubiquitine et une SUMO E3 ligase et enfin, PML et les protéines de la famille TRIM qui possèdent un domaine RING contenant un motif TRIM/RBCC (Chu and Yang, 2011; Gao et al., 2008; Weger et al., 2005).

5. Séquences régulatrices de la SUMOylation

a) Motif consensus de SUMOylation

La conjugaison de SUMO a lieu majoritairement sur des lysines réceptrices incluses au sein d'un motif consensus (**Figure 8**). Il existe plusieurs versions des site consensus de SUMOylation, la séquence la plus simple et la plus répandue étant ψ -K-x- [D/E], dans laquelle ψ 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. L'ajout artificiel de ce motif sur une protéine associé à un signal d'importation nucléaire suffit à induire sa SUMOylation (Rodriguez et al., 2001). Ces résidus interagissent directement avec Ubc9 et ont donc un rôle critique dans la stabilisation des interactions entre l'enzyme E2 et le substrat. Des études structurales de complexes entre Ubc9 et des substrats contenant des motifs consensus SUMO démontrent que le site consensus adopte une conformation particulière dite « étendue ». La lysine acceptrice s'insère dans une encoche hydrophobe d'Ubc9, et les interactions hydrogène entre l'enzyme E2 et les résidus du substrat qui flanquent la lysine

facilitent la reconnaissance du site consensus. Ainsi, la façon dont le motif est présenté à la surface de la protéine a une grande importance. Si ce motif est enterré au sein d'un domaine globulaire, il ne pourra pas être reconnu par Ubc9. Seuls ceux situés dans des zones non structurées donc plus labiles, ou sur des boucles externes pourront interagir avec l'enzyme E2 (Gareau and Lima, 2010).

b) Dérivés du motif consensus de SUMOylation

En condition physiologique, au moins 50% des substrats de SUMO sont modifiés au niveau du motif consensus classique de quatre acides aminés (Pichler et al., 2017). Toutefois, il existe des séquences plus étendues telles que les motifs PDSM (« *Phosphorylation-dependent SUMOylation motif* ») et les motifs NDSM (« *Negatively charged amino-acid-dependant SUMOylation motif* »). Ces motifs PDSM sont constitués d'un site de SUMOylation classique à proximité d'un site de phosphorylation Serine et Proline (ψ -K-x-[D/E]-x-x-S-P). Selon une récente étude, 9% des sites SUMO identifiés dans une lignée cellulaire étaient situés à proximité d'un site de phosphorylation (Hendriks et al., 2017). La sérine ou la proline phosphorylée augmente l'affinité du site pour l'enzyme Ubc9. HSF1 (« *Heat shock factor 1* »), par exemple est phosphorylé lors d'un stress ce qui augmente sa modification par SUMO au niveau des motifs PDSM (Hietakangas et al., 2003, 2006). Dans le cas de PPAR γ (« *Peroxisome proliferator-activated Receptor γ* ») et MEF2A (« *Myocyte enhancer factor 2* »), la SUMOylation phospho-dépendante convertit ces facteurs de transcription d'activateurs en répresseurs. L'augmentation de l'affinité d'Ubc9 pour les substrats est également observée pour les protéines qui contiennent des NDSM (Gareau and Lima, 2010).

Il est intéressant de noter que d'autres modifications comme l'acétylation et la méthylation peuvent également avoir un impact sur la SUMOylation, nous y reviendrons plus tard (Hendriks et al., 2014).

Les différentes séquences consensus décrites peuvent légèrement différer selon les substrats. Elles peuvent par exemple être inversées ([ED]-x-K-x[\neq ED]) ou encore être incluses dans un motif nommé HCSM (« *Hydrophobic cluster SUMOylation motif* ») comprenant un *cluster* hydrophobe N-terminal d'au moins trois résidus (Matic et al., 2010). Grâce à l'évolution toujours croissante de méthodologies permettant d'étudier les protéomes, et notamment la spectrométrie de masse, il est devenu plus simple d'identifier les sites de SUMOylation, en

particulier les séquences dégénérées. Ainsi, plusieurs études de SUMOylation ont été réalisées ces dernières années, et un logo d'enrichissement des acides aminés autour du site consensus de SUMOylation a été créé à la suite de la compilation des sites de SUMO identifiés (**Figure 7**) (Hendriks et al., 2018).

Les séquences consensus SUMO, bien que parfois dégénérées, sont donc les lieux principaux de SUMOylation en condition physiologique. Toutefois, en conditions de stress tel qu'un choc thermique, la SUMOylation devient moins stricte et, à l'instar de l'ubiquitination, peut venir modifier les résidus lysines de la protéine cible à proximité sans pour autant qu'elles soient situées au niveau d'une séquence consensus (Hendriks and Vertegaal, 2016).

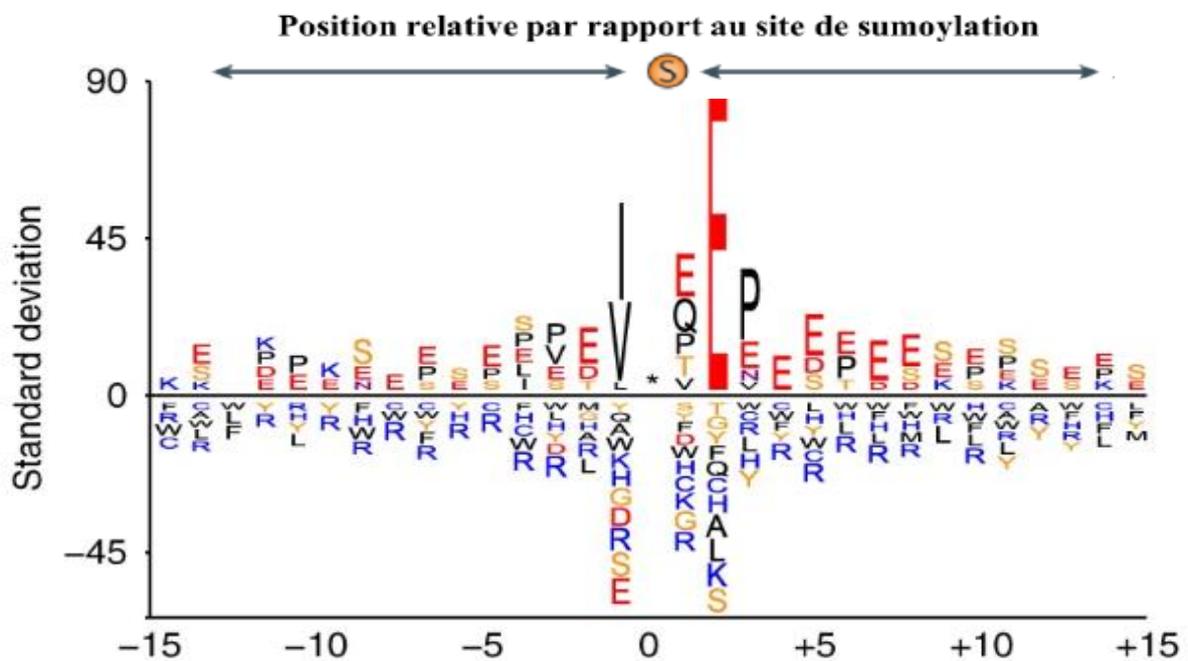


Figure 7 : « Ice logo » du site consensus de sumoylation.

Représentation des aminés enrichis autour des 10% des lysines les plus SUMOylées identifiées dans les cellules humaines, à la position 0, indiquée par l'astérisque. Les résidus affichés au-dessus de la ligne sont enrichis au niveau des sites SUMO tandis que ceux sous la ligne sont relativement appauvris au sein de ces mêmes sites. Adapté de *Hendriks et al., 2018*.

c) Les SIMs

Outre les motifs consensus de fixation de SUMO permettant l'interaction entre Ubc9 et ses substrats, il existe des séquences SIM (ou SBM pour « *SUMO binding motif* ») qui permettent des interactions non covalentes entre les protéines cibles qui la porte et SUMO

(Figure 8). Une protéine SUMOylée peut ainsi reconnaître une autre protéine possédant une SIM et se fixer à cette dernière, formant alors une interaction pouvant aller de faible à modérée. Pour exemple, le SIM de PIAS1 présente une affinité (K_D) pour SUMO-1 de 2 μM et celui de PML pour SUMO-1 est de 36 μM tandis que l'affinité des interactions entre les UBDs et l'Ubiquitine est comprise entre 10 et 500 μM (Kerscher, 2007; Kötter et al., 2019). Les SIM comportent trois à quatre acides aminés hydrophobes la plupart du temps flanqués en N-terminal ou en C-terminal de résidus serines ou acides qui pourraient contribuer à la spécificité de liaison au substrat. Les SIM permettent également la SUMOylation de certaines protéines *via* la reconnaissance du SUMO chargé sur Ubc9. Ces protéines SUMOylées dépendantes d'une SIM sont en général modifiées au niveau de plusieurs sites, y compris des résidus lysines ne faisant pas parties d'un motif consensus. La mutation des résidus modifiés n'abolit pas la SUMOylation de ce substrat tant que d'autres résidus lysines sont accessibles. C'est le cas par exemple des protéines Daxx (« *Death domain associated protein* »), BLM (« *Bloom syndrome recQ helicase-like protein* ») ou Usp25 (« *Ubiquitin-specific protease 25* ») (Chang et al., 2011; Meulmeester et al., 2008; Zhu et al., 2008). La SUMOylation de certains substrats peut être considérablement améliorée lorsque Ubc9 est SUMOylé sur la lysine 14 car cette modification accroît son interaction avec la protéine cible au niveau du motif SIM portée par cette dernière (Knipscheer et al., 2008).

d) SUMOylation dépendante d'une E3 ligase

Certaines protéines cibles de SUMO ne peuvent être conjuguées qu'en présence d'une E3 car elles sont SUMOylées sur des lysines qui ne sont pas accessibles au complexe Ubc9-SUMO lui-même (**Figure 8**). Cela a été décrit pour la protéine de levure PcnA (« *Proliferating cell nuclear antigen* »). Bien que la lysine 127 fasse partie d'un motif consensus SUMO pouvant être modifié directement par Ubc9, la SUMOylation de la lysine 164 dépend strictement de la ligase E3 Siz1 (Yunus and Lima, 2009). Les E3 ligases vont permettre de positionner correctement le substrat par rapport au site catalytique d'Ubc9, voir même de changer la conformation de la protéine cible pour exposer le site de SUMOylation.

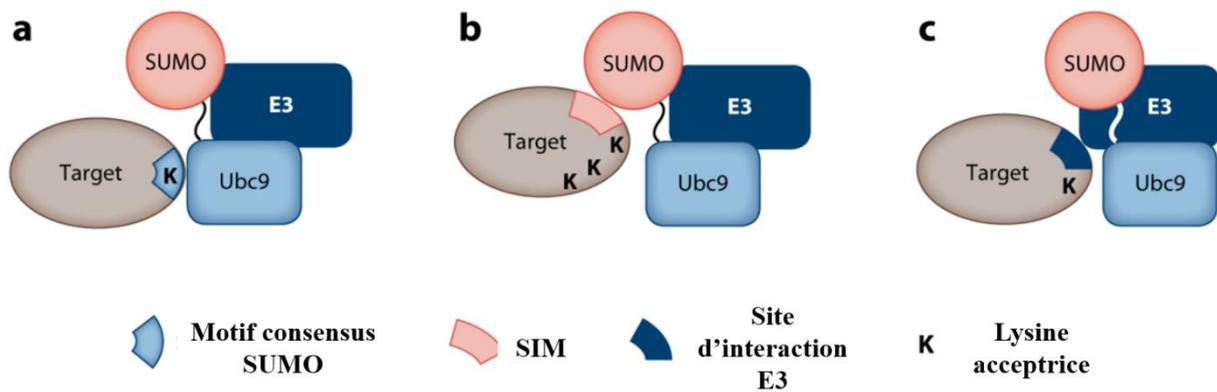


Figure 8 : Spécificité des interactions déterminée par les sites de SUMOylation.

La reconnaissance du substrat par SUMO-Ubc9 peut faire intervenir : (a) une séquence consensus au niveau du substrat, (b) un SIM présent dans le substrat, (c) ou reposer majoritairement sur l'interaction avec une E3 ligase. La conjugaison de SUMO avec son substrat peut avoir lieu sans l'action d'une E3 ligase comme c'est le cas avec RanGAP1. Il est toutefois plus courant que cette étape fasse intervenir une enzyme E3. Adapté de *Flotho and Melchior, 2013*.

6. Nombre de substrats modifiés

Les cellules Eucaryotes contiennent un nombre important de protéines SUMOylées impliquées dans diverses fonctions essentielles. L'identification de l'ensemble des protéines SUMOylées, aussi appelé SUMOylome, dans un organisme, une lignée cellulaire, un tissu ou encore sous l'effet de différents stress cellulaires procure des informations capitales sur les différents rôles de la SUMOylation dans ces conditions (Hendriks and Vertegaal, 2016; Hendriks et al., 2017, 2018; Lumpkin et al., 2017; Matic et al., 2010). La production du SUMOylome est rendu possible grâce à la rapide évolution des techniques de protéomiques ces dernières années, notamment grâce à l'emploi de la spectrométrie de masse. Les méthodologies permettant d'aboutir à un SUMOylome n'ont, elles-mêmes, pas cessé d'être améliorées. On est maintenant capable non seulement de définir le SUMOylome endogène d'un organe ou d'une lignée cellulaire, mais aussi d'identifier les sites précis de SUMOylation (Lumpkin et al., 2017; Hendriks et al., 2018). Ainsi, une récente étude réalisée sur la lignée cellulaire HEK293T, a permis d'identifier 14 869 sites SUMO-2/3 uniques correspondant à 3870 protéines SUMOylées endogènes. Toutefois, les lignées de cellules cancéreuses immortalisées ne sont généralement pas représentatives des conditions physiologiques d'un tissu. C'est pourquoi les auteurs ont réalisés le SUMOylome de huit organes de Souris, ce qui les a mené à la cartographie de près de 2000 sites SUMO-2/3 sur 955 protéines codantes (**Figure 9**) (Hendriks

et al., 2018). Bien que cette étude inclue plusieurs lignées cellulaires et organes, et que d'autres travaux ont abouti à différents SUMOylomes sous diverses conditions, il reste encore autant de SUMOylome à définir que de tissus, d'organismes et de conditions existantes dans la nature, ce qui suggère que de nombreux substrats restent encore à découvrir. Cependant, ces données partielles soulignent le caractère massif de cette modification essentielle.

Il convient de noter que la plupart des SUMOylomes concernent SUMO-2/3 ou n'établissent pas de distinction entre les différents paralogues. Les méthodes réalisées à ce jour ne comportent pas d'anticorps efficaces pour la détection endogène de SUMO-1. Toutefois, en couplant les techniques de SILAC (« *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* ») et de spectrométrie de masse, 295 sites SUMO-1 ont été identifiés correspondants à 227 protéines modifiées (Impens et al., 2014). Par la suite, une analyse de compilation de SUMOylomes réalisée par Hendriks et Vertegaal a permis l'identification de 816 sites SUMO-1 (Hendriks and Vertegaal, 2016).

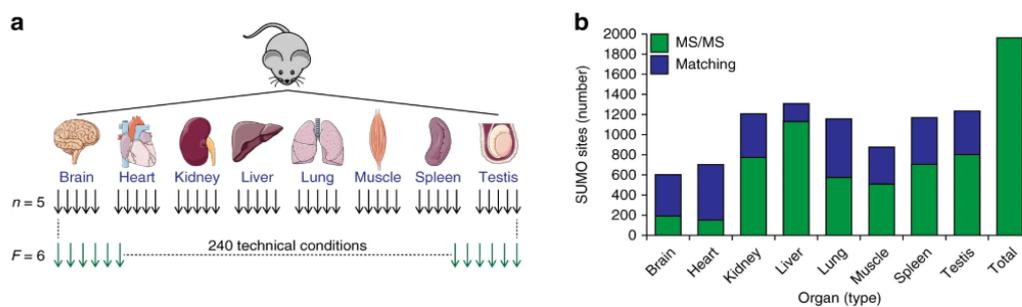


Figure 9 : Cartographie des sites de SUMOylation selon les organes chez la Souris.

(a) Conception expérimentale de SUMOylomes réalisés chez la souris. Huit types d'organes ont été étudiés à partir de cinq répliquats biologiques et ont été analysés en six fractions (répliquats techniques). (b) Nombre de sites SUMO-2/3 identifiés par organe, en comparant les identifications directes (MS / MS), aux identifications réalisées ensuite lors de l'appariement des données entre les organes. Adapté de Hendriks et al., 2018.

C. Interactions entre la SUMOylation et d'autres modifications post-traductionnelles

Les lysines réceptrices de SUMO servent également de sites de fixation pour d'autres modifications traductionnelles telles que l'ubiquitination, l'acétylation et la phosphorylation. Il est donc possible que ces modifications se régulent mutuellement en entrant en compétition pour les mêmes lysines. Une modification sur une lysine du substrat peut également favoriser

la modification d'une lysine adjacente par un autre processus. Le réseau de communication des protéines SUMOylées ne se limite pas à cette seule modification. SUMO agit de manière connectée avec de nombreuses autres modifications post-traductionnelles, créant ainsi nombres de possibilités d'interactions et de combinaisons (Hendriks and Vertegaal, 2016).

1. Ubiquitination

Une des manières dont SUMO affecterait la fonction de ses substrats serait en entrant en compétition avec l'ubiquitination au niveau de certains résidus lysine. Par exemple, PcnA, Smad4 (« *SMAD family member 4* ») et IκB-α (« *Inhibitor of kappa-b alpha* ») possèdent tous une lysine pouvant être SUMOylée ou ubiquitinée. La SUMOylation d'IκB-α empêche son ubiquitination. Or, l'ubiquitination d'IκB-α conduit à sa dégradation par le protéasome, ce qui libère le facteur de transcription NFκB (« *Nuclear factor kappa B* »). Ainsi la modification par SUMO de cette lysine permet de stabiliser IκB-α et de bloquer l'activation de la voie NFκB (**Figure 10**) (Desterro et al., 1998).

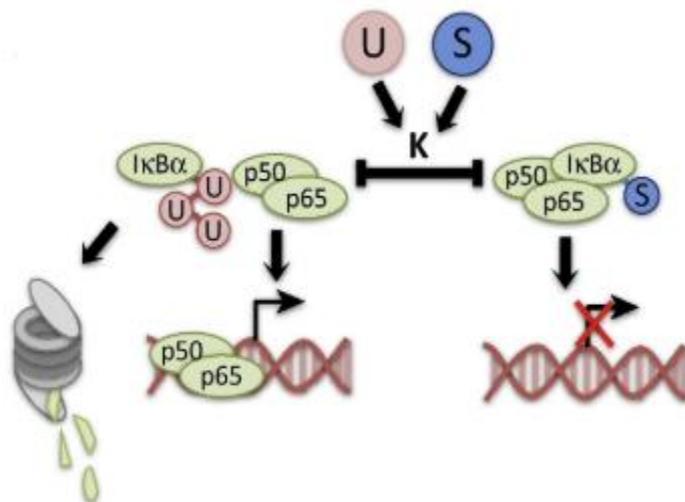


Figure 10 : Compétition entre SUMO et l'ubiquitine au niveau de la lysine du facteur de transcription IκB-α.

SUMO (S) et l'Ubiquitine (U) sont en compétition pour la même lysine (K) présente sur IκB-α, un répresseur de NFκB. Son ubiquitination conduit à la dégradation protéasomique d'IκB-α ce qui libère les deux sous-unités p65 et p50 qui compose NFκB et permet son activité transcriptionnelle, tandis que sa SUMOylation stabilise IκB-α ce qui empêche l'activation de la voie NFκB. Adapté de Eifler and Vertegaal, 2015.

Cependant, l'interaction entre ces deux modifications n'est pas limitée au ciblage du même résidu lysine. Leurs relations peuvent être antagonistes mais aussi coopératives, comme c'est le cas lors de la dégradation des protéines *via* l'ubiquitination SUMO-dépendante. En effet les chaînes poly-SUMO peuvent être reconnues par des StUbls qui entraînent l'ubiquitination du substrat et sa dégradation par le protéasome en recrutant une enzyme E2 de l'Ubiquitine. La StUbl la mieux caractérisée à ce jour est la Rnf4 des mammifères qui possède une séquence de quatre SIMs adjacents qui lui permet de reconnaître les chaînes de SUMO-2/3, et un domaine RING pour assurer son rôle d'Ubiquitine E3 ligase (**Figure 11**) (Staudinger, 2017).

L'étendue des interactions entre la SUMOylation et l'ubiquitination a été estimée lors de la compilation de SUMOylome réalisée par Hendriks et Vertegaal en 2016. Environ 24% des sites SUMO identifiés étaient également des sites d'ubiquitination (Hendriks and Vertegaal, 2016).

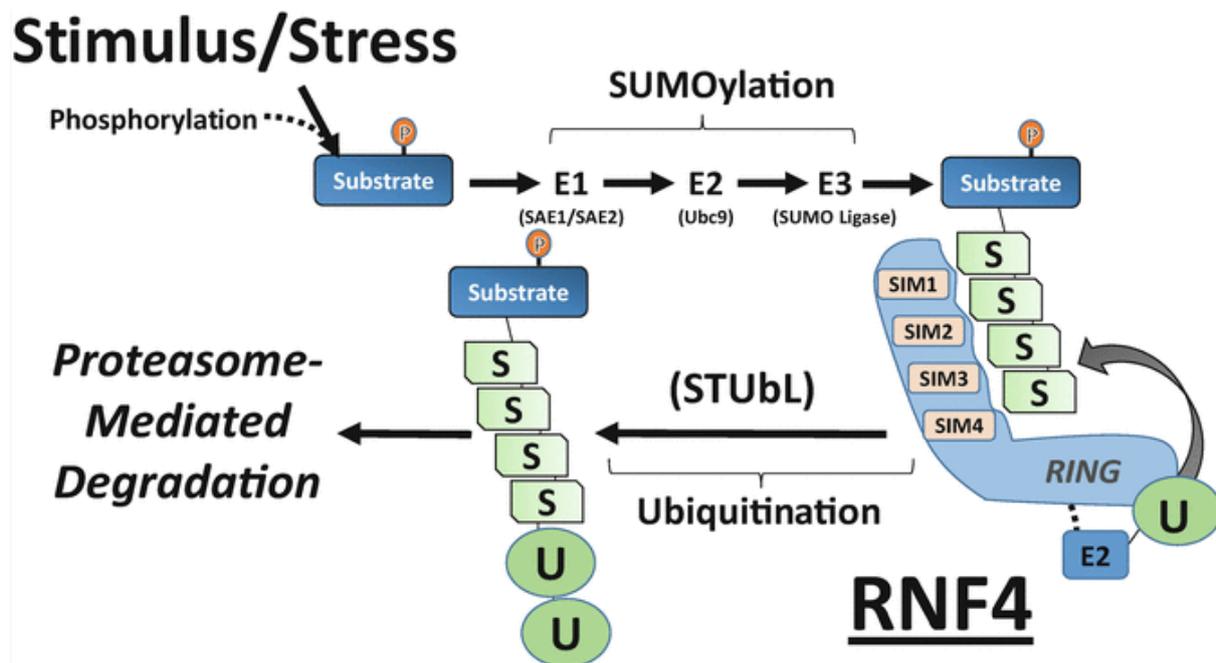


Figure 11 : Schéma du mode d'action de RNF4 via les interactions entre les StUbls et SUMO.

Un stimulus ou un stress entraîne la phosphorylation d'une potentielle protéine cible de SUMO. La cascade de SUMOylation donne lieu à une poly-SUMOylation du substrat dont la chaîne poly-SUMO-2/3 est reconnue par la « *SUMO-targeting Ubiquitin ligase* » (StUbl) de Rnf4 via ses quatre SIMs en tandem. Ce complexe favorise le recrutement d'une enzyme E2 de l'Ubiquitine, permettant ainsi la formation de chaînes mixtes SUMO-Ubiquitine qui sont ensuite reconnues par le protéasome, menant à la dégradation du substrat. U = Ubiquitine, S = SUMO. De Staudinger, 2017.

2. Phosphorylation

Il est bien connu que la phosphorylation d'un substrat peut favoriser sa SUMOylation en renforçant les interactions entre l'enzyme Ubc9 et la protéine modifiée. Les motifs PDSM déjà mentionnés en sont un exemple clé. La phosphorylation directe d'un site SIM est aussi un mécanisme décrit comme favorisant la modification par SUMO. Prenons l'exemple de la protéine Daxx qui interagit avec Ubc9 chargé par le biais d'un site SIM. Cette interaction est de faible affinité lorsque que la modification est réalisée par SUMO-1. Or, la phosphorylation du site SIM au niveau des résidus Sérines 737 et 739, par la kinase CK2 (« *Casein kinase 2* ») favorise la modification de Daxx par SUMO-1 en augmentant le nombre d'interactions électrostatiques qui se forment. De plus, cela entraîne la conjugaison sélective de SUMO-1 plutôt que SUMO-2/3, ce qui démontre que la régulation de la SUMOylation *via* la phosphorylation peut aussi avoir un impact sur la sélection des paralogues SUMO conjugués. L'augmentation de la modification de Daxx par SUMO permet ensuite sa localisation au niveau des corps PML dans le noyau, et la répression transcriptionnelle des gènes anti-apoptotiques (Chang et al., 2011).

Ce phénomène peut aussi avoir lieu sur une séquence non-consensus de SUMO. Par exemple, en réponse à un stress génotoxique, la protéine PML est phosphorylée par ERK (« *Extracellular signal-regulated kinases* ») ou Hipk2 (« *Homeodomain-interacting protein kinase* ») ce qui augmente sa modification par SUMO. Or, la phosphorylation par Hipk2 a lieu au niveau des résidus 8, 36 et 38, mais la SUMOylation est réalisée au niveau d'une lysine plus carboxy-terminale et ne correspondant pas à un motif SUMO, associée elle-même à la SUMOylation préalable de deux lysines encore plus C-terminale situées quant à elle sur des séquences consensus (Müller et al., 1998; Gresko et al., 2009).

La phosphorylation d'un substrat peut également entrer en compétition avec sa SUMOylation et donc avoir une action antagoniste. La régulation négative de la voie SUMO par la phosphorylation peut s'exercer par l'inhibition des interactions avec les enzymes E2 ou E3 ou au contraire par le recrutement de désSUMOylases, mais aussi par la relocalisation des substrats, ou par la promotion d'autres modifications des lysines. Ainsi, la phosphorylation de Satb1 (« *SATB homeobox 1* ») empêche l'interaction et le recrutement de la SUMO E3 ligase Pias1, tandis que la phosphorylation de Gcm1 (« *Glial cell missing 1* ») entraîne le recrutement de la désSUMOylase Senp1 ce qui diminue la fraction de protéines Gcm1 conjuguées (Gareau and Lima, 2010; Chang et al., 2011).

Pour finir, selon l'étude de SUMOylome réalisée par Hendriks, 9% des modifications par SUMO en conditions standards de croissance ont lieu au niveau d'un peptide phosphorylé (Hendriks et al., 2017). Etant donné la difficulté d'identifier des co-modifications sur un peptide en spectrométrie de masse, cette observation suggère que les interactions entre la SUMOylation et la phosphorylation est un phénomène de forte occurrence.

3. Acétylation

L'acétylation interagit aussi avec la SUMOylation. Son action est antagoniste car elle entre en compétition avec SUMO pour la modification des lysines. Prenons l'exemple de Mef2a déjà cité en raison de son site PDSM qui favorisait la SUMOylation. Tandis que SUMO inhibe son activité transcriptionnelle, l'acétylation de cette même lysine la favorise (Hendriks and Vertegaal, 2016). De même, la SUMOylation de p53 bloque son activité transcriptionnelle en inhibant sa liaison à l'ADN, tandis que l'acétylation de p53 joue un rôle antagonisme en restaurant la capacité de p53 à se lier à l'ADN. De plus, la SUMOylation peut bloquer l'acétylation des résidus de lysine C-terminaux adjacents, certainement en raison d'un encombrement stérique et des changements de conformation induits par le groupement SUMO. L'inverse n'est toutefois pas vrai, et p53 acétylé peut tout aussi bien être SUMOylé que sa forme libre (Wu and Chiang, 2009).

Il a aussi été montré que l'acétylation des paralogues SUMOs régule les interactions SUMO-SIM. En particulier, l'acétylation de SUMO-1 sur la lysine 37 ou de SUMO-2 sur la lysine 33 bloque sa liaison aux SIM. Ce mécanisme a été prouvé pour PML, Daxx et certaines PIASs. De plus, les résidus lysines acétylés des histones et des facteurs de transcription étant spécifiquement reconnus par les bromodomains, des expériences ont été réalisées pour démontrer que la lysine 33 acétylés de SUMO-2 était spécifiquement reconnue par le bromodomaine de p300 (Ullmann et al., 2012).

4. Interconnexion entre les différentes modifications

Selon l'analyse des différents SUMOylomes par Hendriks and Vertegaal, ~ 29% des 7710 sites de SUMOylation sont co-modifiés avec l'acétylation, la méthylation ou l'ubiquitination (Hendriks and Vertegaal, 2016). Comme cité précédemment, 9% des sites SUMO se trouvent

à proximité d'un site de phosphorylation. Les paralogues SUMO peuvent être eux-mêmes soumis à ces modifications sous leur forme de monomère ou de poly-chaînes (**Figure 12**). Une même protéine SUMO peut être soumise à une ou plusieurs modifications ou co-modifications. De même, une chaîne SUMO peut subir différentes modifications. Les différentes modifications post-traductionnelles peuvent donc se combiner, que ce soit au niveau du substrat sur un ou plusieurs résidus, ou de SUMO afin d'augmenter les possibilités de signalisation. Ainsi, la SUMOylation peut non seulement être régulée par la modification des substrats, mais aussi par sa propre modification.

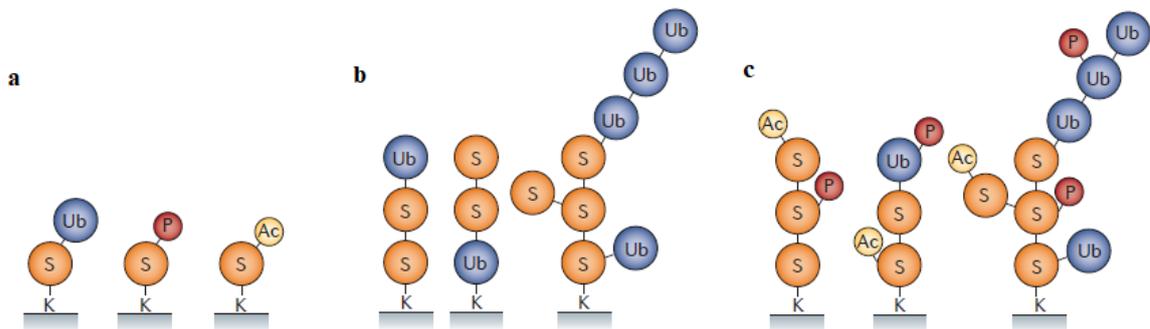


Figure 12 : Signalisation complexes via l'interconnexion entre la SUMOylation et différentes modifications post-traductionnelles.

(a) Les paralogues SUMOs (S) peuvent être eux-mêmes ubiquitinés (Ub), phosphorylés (P) ou acétylés (Ac). (b) SUMO peut former des chaînes mixtes avec l'Ubiquitine. L'Ubiquitine peut être SUMOylée ou inversement. (c) Les chaînes SUMO et SUMO-Ubiquitine peuvent être phosphorylées ou acétylées, augmentant encore la complexité de la signalization. *Hendriks and Vertegaal, 2016.*

D. Modèles d'études de la SUMOylation

Comme nous l'avons vu, la SUMOylation est essentielle à la survie d'un organisme et une délétion d'un élément central de cette voie est létale dès les premières étapes du développement embryonnaire. Il existe toutefois plusieurs méthodes d'étude de cette modification que ce soit *in vitro* ou *in vivo* afin d'induire une hypoSUMOylation partielle ou une délétion totale dans une lignée cellulaire spécifique.

Il existe différents types de molécules inhibitrices de la SUMOylation. Ces principes actifs peuvent inhiber Sae ou Ubc9 et ainsi affecter l'intégralité de la voie SUMO, car toutes les isoformes SUMO sont activées et conjuguées par ces enzymes. Ils peuvent aussi cibler les

ligases ou les SENPs (Jia et al., 2019). Les premiers inhibiteurs pharmacologiques de la SUMOylation sont l'acide ginkgolique, l'acide anacardique et la kerriamycine B qui inhibent la formation du pont thioester entre l'enzyme E1 et le peptide SUMO (Fukuda et al., 2009a, 2009b). D'autres composés naturels fonctionnant de la même manière tels que la davidiine et l'acide tannique ont été découverts ultérieurement (Suzawa et al., 2015; Takemoto et al., 2014). Le premier inhibiteur de l'enzyme E2 est une molécule naturelle d'origine fongique, la spectomycine B1 qui empêche la formation du pont thioester entre Ubc9 et SUMO-1. Des composés structurellement apparentés tels que la chaetochromine A et la viomelleine ont été montré comme agissant de manière similaire *in vitro*. L'inhibiteur 2-D08 est quant à lui une molécule synthétique qui se fixe de manière covalente à Ubc9, inhibant ainsi le transfert de SUMO au substrat (Hirohama et al., 2013; Kim et al., 2014). Toutefois, ces inhibiteurs présentent des limites non-négligeables : ils doivent être utilisés en quantité importante pour être efficaces et ne ciblent pas que la voie SUMO. Plus récemment, deux inhibiteurs particulièrement spécifiques ont été développés : le ML-792 ainsi que son dérivé Tak-981. Ils entravent l'activité de Sae1/2 en formant un adduit avec SUMO de manière ATP-dépendante (He et al., 2017; Langston et al., 2021).

D'autres outils permettent l'étude de la voie SUMO tels que les shRNAs (« *small hairpin RNA* ») et siRNAs (« *small inhibiting RNA* ») qui permettent d'inhiber spécifiquement l'expression d'un membre de la voie SUMO et d'entraîner une hypo ou une hyperSUMOylation de la voie selon la cible choisie. Pour une diminution globale de la SUMOylation, on choisira ainsi un siRNA dirigé contre *Ubc9*.

Lors de l'étude de la SUMOylation d'un substrat, il est commun de muter le site de conjugaison de SUMO. On peut ainsi muter une lysine en arginine ou cibler le glutamate du site consensus si la lysine est la cible d'autres modifications post-traductionnelles.

Différents modèles murins sont également disponibles au laboratoire grâce au développement d'un modèle de délétion conditionnelle d'*Ubc9* (*Ubc9^{fl/fl}*) couplé à un système Cre-LoxP permettant d'induire la délétion des exons 2 et 3 du gène codant pour *Ubc9* grâce à l'ajout de tamoxifène (Demarque et al., 2011). Il est ainsi possible de supprimer la SUMOylation dans des tissus spécifiques. Par exemple, il existe un modèle de souris au laboratoire dont la lignée myéloïde est déficiente en *Ubc9* (*Ubc9^{fl/fl}Lyz2-Cre*) grâce aux croisements de souris *Ubc9^{fl/fl}* et *Lyz2-Cre*, *Lyz2* étant un promoteur spécifique à la lignée myéloïde (Decque et al., 2016). A l'aide d'un promoteur ubiquitaire, les souris *Ubc9^{fl/fl}* ont aussi

donné lieu à un modèle de souris hétérozygote *Ubc9^{+/-}* qui ne présentent plus qu'un allèle fonctionnel et voient leur niveau de SUMOylation réduit de moitié (Demarque et al., 2011).

E. Rôles de la SUMOylation

La SUMOylation est un processus complexe, essentiel et ubiquitaire. Ses conséquences sur les substrats sont variées et ses fonctions cellulaires sont multiples. De nombreux rôles ont déjà été attribués à cette petite protéine, et de nombreux autres restent encore certainement à découvrir. Lors de cette partie, nous décrirons l'action de SUMO sur ses substrats ainsi que quelques-uns de ses rôles connus.

1. Impact de la SUMOylation sur ses substrats

La modification d'un substrat par SUMO peut avoir des effets variés sur celui-ci. Entre autres, cela peut modifier sa localisation, sa fonction ou encore sa stabilité. Bien que les conséquences de la SUMOylation soient nombreuses, les changements moléculaires que cette modification induit sur ses substrats peuvent être classés en quatre catégories (**Figure 13**).

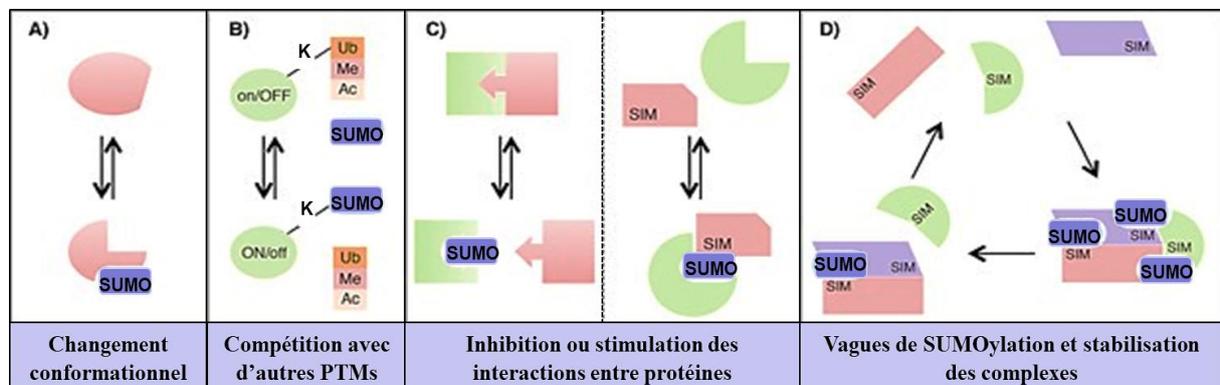


Figure 13 : Conséquences moléculaires de la SUMOylation sur les substrats.

(a) La conjugaison avec SUMO induit un changement conformationnel de la protéine cible. (b) La SUMOylation agit en compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles. (c) La conjugaison avec SUMO peut inhiber ou favoriser via des SIM les interactions entre protéines. (d) Des vagues de SUMOylation peuvent modifier plusieurs protéines d'une même voie en réponse à un stress cellulaire ce qui entraîne la stabilisation de complexes. K = lysine conjuguée, Ub = Ubiquitine, Me = groupement méthyle, Ac = groupement acétyle. Adapté de *Chymkowitch et al., 2015*.

a) Changement conformationnel des substrats

En se conjuguant à son substrat, SUMO altère la structure conformationnelle de ce dernier, ce qui peut affecter sa fonction. Par exemple, il a été démontré que la protéine TDG (« *Thymine DNA glycosylase* ») impliquée dans la réparation de l'ADN par excision de base est modifiée de manière covalente par SUMO-1 et SUMO-2/3. Cette protéine se lie avec et hydrolyse les bases thymines et uraciles mésappariées dans l'ADN double brin, elle reste ensuite fixée au site de lésion. Sa conjugaison avec SUMO modifie la structure conformationnel de TDG inhibant ainsi son interaction avec l'ADN endommagé. Cela permet un renouvellement de cette protéine ce qui a pour conséquence d'améliorer la réparation de l'ADN (Smet-Nocca et al., 2011).

b) Compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles

Comme nous l'avons décrit précédemment, SUMO peut interagir et entrer en compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles, modifiant ainsi le destin de la protéine cible.

c) Modifications des interactions entre protéines

SUMO peut favoriser ou inhiber les interactions entre protéines en formant par exemple une nouvelle plateforme de liaison ou en empêchant la liaison d'autres protéines par un encombrement stérique ou encore, comme décrit plus haut, en induisant un changement de conformation qui viendra exposer ou cacher un site de liaison.

L'exemple du facteur de transcription Sp1 souligne l'effet bivalent de SUMO sur les interactions entre les protéines. En effet, lors du développement embryonnaire, la SUMOylation de Sp1 par SUMO-2/3 empêche son interaction avec l'acétyltransférase p300 pendant la différenciation du cristallin de l'oeil tandis que sa modification par SUMO-1 favorise cette interaction (Gong et al., 2014).

Outre cela, les interactions entre protéines peuvent être favorisées grâce à la présence de motifs SIM. En effet, une protéine SUMOylée pourra ainsi reconnaître et se fixer sur la ou les SIMs présents sur d'autres protéines. On peut citer comme exemple le premier substrat de SUMO identifié, RanGAP1, dont la SUMOylation est nécessaire pour son interaction avec la

nucléopore Nup358 *via* un SIM ; ou encore p53 dont l'interaction SIM-dépendante avec Crm1 (« *Chromosomal maintenance 1* ») est nécessaire à son exportation nucléaire (Mahajan et al., 1997; Santiago et al., 2013).

d) **Stabilisation des complexes protéiques**

Chez la Levure, les Plantes et les Humains, des vagues de SUMOylation de protéines ont été rapportées en réponse à un stress cellulaire. La concentration de SUMO conjugués augmente alors considérablement, ce qui stimule les interactions entre les protéines SUMOylées et celles contenant des SIMs, notamment au niveau des complexes. SUMO permet alors de stabiliser ces complexes. Nous décrirons ce phénomène plus en détail lors de la description du rôle de SUMO en réponse à divers stress cellulaire.

2. **Rôles nucléaires de SUMO**

De nombreuses mutations de la voie SUMO entraînent des problèmes au niveau des structures nucléaires et chromatiniques (Zhao, 2018). De plus, les protéines de la voie SUMO et un grand nombre de protéines SUMOylées sont enrichies dans le noyau. C'est donc sans surprise que SUMO s'est vu attribuer une place de choix dans nombreux processus nucléaires et chromatiniques tels que la régulation de la transcription, la mitose et le cycle cellulaire, la structure et le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN et bien d'autres encore. La **Figure 14** résume les effets nucléaires principaux de la SUMOylation. Nous ne décrirons ici que les fonctions de SUMO au niveau de la régulation de la transcription et de la modification des histones et de la chromatine. Cela nous permettra par la suite de mieux appréhender le rôle de SUMO dans l'identité cellulaire et plus particulièrement dans la plasticité cellulaire, une thématique essentielle pour l'un des projets de cette thèse.

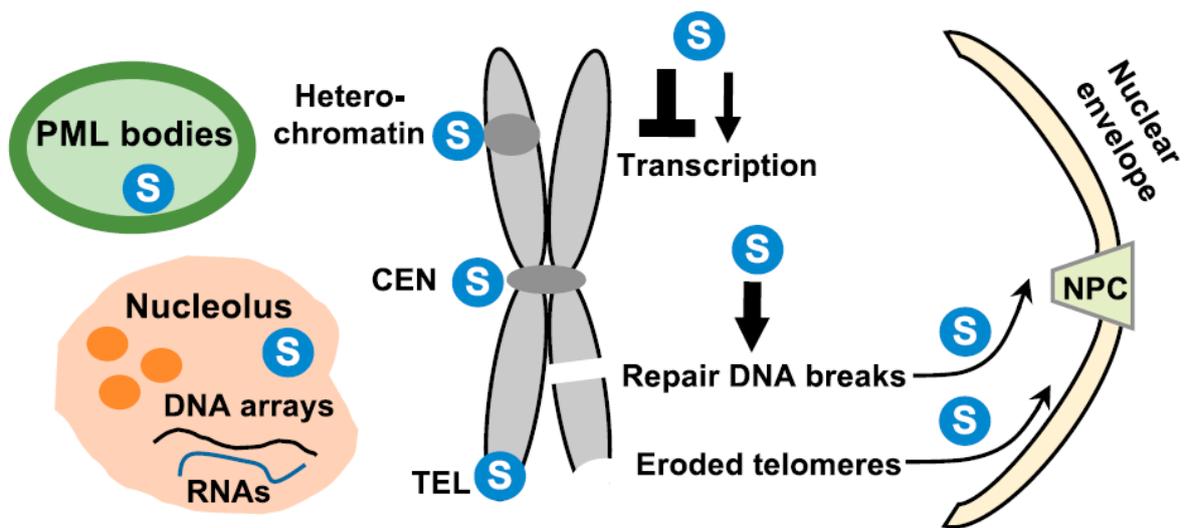


Figure 14 : Effets principaux de la SUMOylation sur les structures et les fonctions nucléaires.

Les domaines nucléaires et régions chromosomiques enrichis en protéines SUMO (S) sont représentés. La SUMOylation régule également la transcription et joue un rôle dans la réparation des lésions de l'ADN et le transport nucléaire comme l'indiquent les différentes flèches. Adapté de *Zhao, 2018*.

a) Impact de SUMO sur la transcription

Chez les Eucaryotes, SUMO cible majoritairement des protéines associées à la chromatine, dont des facteurs de transcription (FT) et des cofacteurs, ce qui indique un rôle majeur de cette modification dans la régulation de la transcription. Les premières études portant sur cet aspect de la SUMOylation ont montré un rôle répressif général de la transcription (Gill, 2005; Lyst and Stancheva, 2007). Cette régulation génique négative par la SUMOylation a été très largement confirmée par de nombreuses études ciblées. Des travaux menés par la suite ont, cependant, démontré que SUMO pouvait aussi avoir un rôle activateur de certains FTs tels que

NFAT (« *Nuclear factor of activated T-cells* ») et p53 (Terui et al., 2004; Bischof et al., 2006). Bien que considéré majoritairement comme inhibiteur, différents mécanismes ont été démontrés et mettent en avant un rôle ambivalent de SUMO à la chromatine (**Figure 15**).

Plus récemment, des études à plus grande échelle impliquant des ChiP-seq (« *Chromatin immunoprecipitation sequencing* ») ont révélé la présence de SUMO sur des gènes transcriptionnellement actifs et essentiels à la cellule (Chymkowitch et al., 2015a, 2015b; Liu et al., 2012a; Neyret-Kahn et al., 2013). Selon ces différentes études, l'action de SUMO s'avère être soit inhibitrice soit activatrice. L'impact de SUMO sur la transcription est donc contexte et gène-dépendant mais apparaît comme essentiel pour le contrôle de larges programmes transcriptionnels.

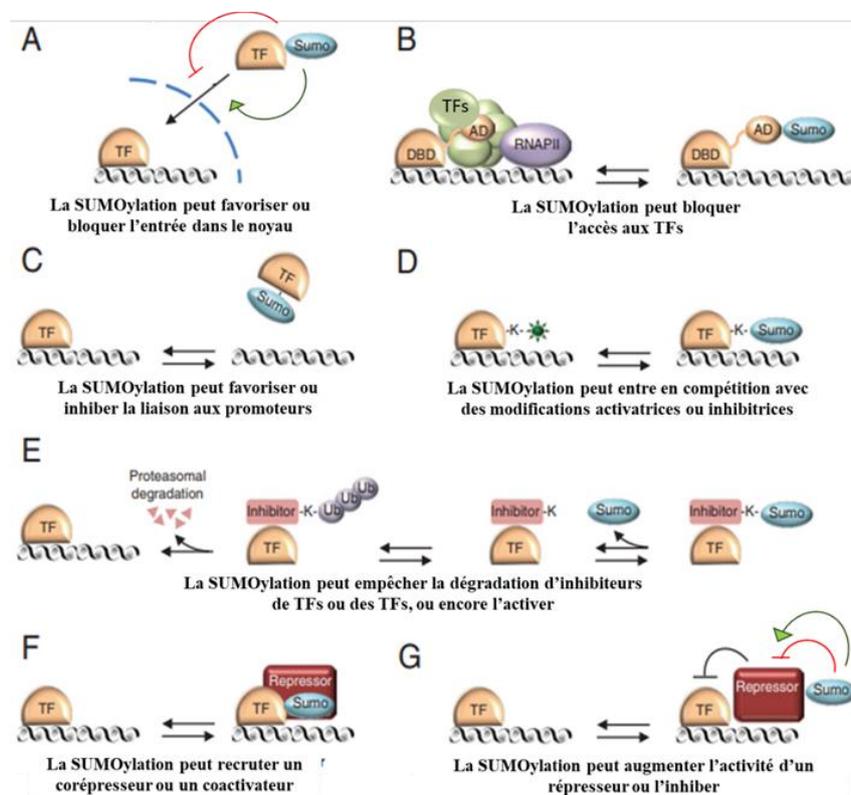


Figure 15 : Différents mécanismes de régulation de la transcription par SUMO.

(A) La SUMOylation peut favoriser ou inhiber l'entrée des FTs dans le noyau, (B) ou empêcher leur recrutement par encombrement allostérique, (C) ou encore améliorer ou inhiber la liaison des FTs aux promoteurs, (D) SUMO est en concurrence avec d'autres modifications qui activent ou inhibent la transcription, (E) SUMO peut empêcher ou favoriser la dégradation d'un inhibiteur de FT ou d'un FT lui-même, (F) ou recruter un corépresseur ou coactivateur transcriptionnel, (G) La SUMOylation peut augmenter ou bloquer l'activité d'un répresseur transcriptionnel. K= lysine acceptrice, Ub = Ubiquitine. Adapté de Enserink, 2015.

Ces dernières années, différentes études par ChiP-seq de FTs ayant subi une mutation du site de liaison de SUMO semblent souligner un rôle général de la SUMOylation dans leur spécificité de liaison. Une compilation de quatre de ces études a été récemment réalisée par Rosonina. Celle-ci indique que lorsque quatre FTs sont mutés au niveau de leur site de SUMOylation, ils se fixent sur de nombreux sites supplémentaires. Ces différentes études suggèrent que la SUMOylation des FTs restreint le répertoire de leurs sites de liaison à l'ADN en modulant leurs interactions avec les autres FTs ou en induisant un changement de conformation qui modifie leur affinité à l'ADN (**Figure 16**) (Rosonina, 2019).

Ce rôle de SUMO dans la spécificité de liaison des TFs vient souligner l'impact complexe de SUMO sur les FTs qui ne se limite pas à activer ou inhiber la transcription à la manière d'un interrupteur.

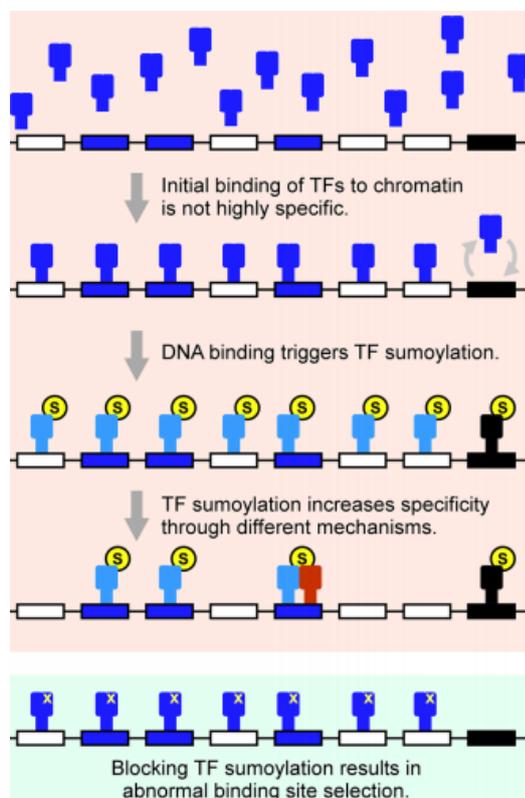


Figure 16 : Rôle de la SUMOylation des facteurs de transcription dans la spécificité du site de liaison.

Avant d'être SUMOylés, les FTs se fixent à l'ADN de manière égale, que leur affinité avec le site soit faible ou élevée (rectangles blanc et bleu respectivement). La liaison des FTs à l'ADN déclenche leur SUMOylation (S). Cela peut provoquer un changement de conformation, ou moduler les interactions avec d'autres FTs (rouge), ce qui augmente leur spécificité. Ainsi, seuls les FTs liés à un site de haute affinité restent fixés (bleu clair). La SUMOylation peut aussi stabiliser les interactions transitoires avec l'ADN (noir). En l'absence de SUMOylation, comme illustré dans le panneau inférieur, la faible spécificité des FTs ne peut pas être modulée après leur liaison à l'ADN, ce qui entraîne la rétention des FTs sur de nombreux sites supplémentaires. *De Rosonina, 2019.*

b) SUMO et modification des histones

Le génome Eucaryote est une structure complexe, finement régulée et organisée sous forme de chromatine composée d'ADN et de protéines. L'unité de la chromatine, le nucléosome, est formée d'un segment d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones. Des structures encore plus condensées peuvent ensuite se former, allant jusqu'au chromosome mitotique. L'état chromatinien, plus ou moins condensé, définit l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcriptions et autres protéines essentielles aux diverses fonctions chromatinienne. La modification des histones est un mécanisme permettant la modulation de l'état de condensation de la chromatine. Les histones sont en effet soumises à un complexe écheveau de modifications post-traductionnelles comprenant entre autres l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation. Cet assemblage de modifications des histones a mené à l'hypothèse d'un « code » des histones qui serait spécifiquement reconnu par des complexes protéiques et traduit en un état chromatinien plus ou moins permissif ou restrictif (Wotton et al., 2017). SUMO agit directement sur la structure du nucléosome en modifiant les histones. Des histones SUMOylées ont de ce fait été découvertes dans de nombreux organismes tels que les plantes ou les parasites ce qui indique un rôle important et conservé de la SUMOylation dans la régulation de l'état chromatinien. Un exemple bien connu est celui de la SUMOylation de l'histone H4 qui favorise son interaction avec une protéine responsable de la formation d'hétérochromatine HP1 γ (« *Heterochromatin protein 1* ») et d'une histone déacétylase Hdac1, ce qui induit une répression transcriptionnelle (Shiio and Eisenman, 2003).

Les quatre histones de la Levure se sont révélées être SUMOylées *in vivo* ce qui semble induire un effet répressif sur l'activité transcriptionnelle. Les sites SUMOylés apparaissent comme enrichis de manière inversement proportionnelle à d'autres modifications bien que ces sites puissent être dans certains cas modifiés à la fois par SUMO et par d'autres modifications post-traductionnelles. Par exemple, la SUMOylation des histones est enrichie au niveau des télomères qui sont maintenus dans un état transcriptionnellement inactif et associés à de faibles niveaux d'acétylation et d'ubiquitination (Nathan et al., 2006). De plus, la SUMOylation de l'histone H2B de la Levure est inversement proportionnelle à son acétylation au niveau de certains gènes inductibles. Ces exemples suggèrent des interactions dynamiques entre la SUMOylation et d'autres modifications post-traductionnelles au niveau des histones et appuie l'hypothèse que SUMO participerait au code des histones modulant l'accès à l'ADN.

c) SUMO et régulation de la chromatine

En plus de sa participation à la régulation de l'état chromatinien en modifiant les histones, SUMO peut également modifier la structure et l'accessibilité de la chromatine en induisant des changements dans l'organisation nucléaire. Comme l'a démontré une étude ciblant Ubc9 chez la Souris réalisée dans notre laboratoire, SUMO a un rôle essentiel pour l'intégrité du noyau, la condensation et la ségrégation des chromosomes et l'organisation de structures subnucléaires telles que les corps nucléaires PML (Nacerddine et al., 2005). SUMO peut également réguler la chromatine en modulant des domaines chromatinien.

Ainsi, chez les Mammifères, SUMO et les protéines SUMOylées sont enrichies dans des régions d'hétérochromatine. Au cours de la méiose dans les cellules mâles, les chromosomes sexuels sont emballés dans une structure nommée « *XY body* », un domaine chromatinien transcriptionnellement inactif et ne subissant pas de recombinaison. On suppose que cette structure serait impliquée dans le maintien de l'inactivation des gènes et la prévention des événements de recombinaison potentiellement délétères entre les chromosomes sexuels. La présence de SUMO au sein de ces structures, et de protéines SUMOylées, dont Daxx et PML, au sein des *XY bodies* suggère un rôle de cette modification dans leur formation et leur maintien (Rogers et al., 2004). SUMO peut également être retrouvé dans l'hétérochromatine constitutive, et plus spécifiquement dans les régions de l'hétérochromatine centromérique sur les chromosomes humains 1 et 9 lors de la méiose (Brown et al., 2008).

Chez la Levure, SUMO est essentiel au maintien de la stabilité de l'hétérochromatine péri-centromérique, où il agit en modifiant les protéines d'hétérochromatine Swi6 (homologue de l'HP1) et Clr4 (Shin et al., 2005). De même, une autre étude dans des lignées cellulaires humaines a montré que la SUMOylation du facteur de transcription SP3 induit le recrutement de Setdb1 (« *SET Domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1* »), Suv4-20h et HP1. Le recrutement de ces protéines entraîne la triméthylation de l'histone 3 lysine 9 (H3K9Me3), au niveau de gènes rapporteurs et mène à l'établissement d'une structure compacte de la chromatine semblable à de l'hétérochromatine (Stielow et al., 2008). Une étude réalisée au laboratoire a également identifié un rôle pour la SUMOylation dans le maintien de cette marque répressive H3K9Me3 dans les cellules souches embryonnaires (Cossec et al., 2018).

Il existe de nombreux autres travaux établissant un lien entre SUMO et l'hétérochromatine, dont sur la SUMOylation de substrats impliqués dans le remodelage de la chromatine, c'est notamment le sujet d'une étude réalisée au laboratoire (Cossec et al., 2018). De même que pour l'ensemble des rôles nucléaires de SUMO, il serait trop long de tous les citer, mais il est important de retenir que SUMO est un régulateur important de la structure chromatinienne, de la transcription et plus globalement des fonctions nucléaires. Ce rôle fondamental de SUMO au noyau explique en partie pourquoi cette modification est impliquée dans la régulation de différents stress cellulaires et dans certaines pathologies telles que le cancer. Nous comprendrons aussi mieux le rôle de SUMO dans la régulation de l'immunité innée et anti-tumorale, qui dépendent en partie de programmes transcriptionnels spécifiques, et dans la plasticité et la régénération cellulaire. Nous présenterons ces deux thématiques de manière plus détaillée lors de deux parties distinctes mais nous allons au préalable introduire les rôles de SUMO lors de stress cellulaires et dans le cancer.

3. SUMO et stress cellulaires

SUMO a des fonctions importantes dans l'homéostasie cellulaire normale mais est également très important pour la réponse au stress cellulaire, comme le montre la formation accrue de substrats conjugués à SUMO lors de nombreux stress cellulaires tels que le stress osmotique, hypoxique, thermique, oxydant et génotoxique. Cette réponse rapide a pour la première fois été démontrée par Saitoh et Hinchev, qui ont aussi montré qu'elle implique surtout les paralogues SUMO-2/3 présents majoritairement sous forme libre dans la cellule, au contraire de SUMO-1 (Saitoh and Hinchev, 2000). A partir de leur compilation de SUMOylome et de leur analyse précise, Hendriks et Vertegaal ont établi un modèle représentant la dynamique de la SUMOylation à la suite d'un stress (**Figure 17**). Ils ont ainsi démontré que suivant différents stress cellulaires et quand bien même la nature de ceux-ci diffère, deux groupes de substrats se formaient : un dont la SUMOylation diminue, et l'autre où elle augmente. En analysant les différentes études qui s'y rapportent, ils ont remarqué que les protéines qui étaient moins SUMOylées étaient pour la plupart des cibles canoniques de SUMO en conditions normales alors que celles dont la SUMOylation augmente n'étaient pas des cibles habituelles (Hendriks and Vertegaal, 2016). Ces découvertes les ont menés au modèle présenté **Figure 17**.

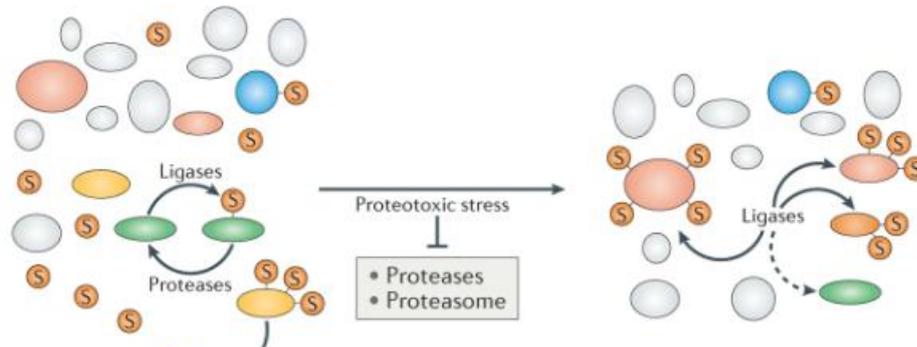


Figure 17 : Dynamique de SUMO en réponse à un stress protéotoxique.

Une fraction de SUMOs (S) libres et non conjugués est présente dans les cellules en conditions normales. Lors de stress cellulaires sévères (comme illustré ici avec le stress protéotoxique c'est à dire un repliement aberrant de nombreuses protéines), la fraction de SUMO libres est rapidement épuisée, et on observe une perte de SUMO au niveau de cibles hautement sumoylées en conditions de croissance standard (ovale vert). Le nouveau stock de SUMO libre ainsi créé va permettre la stabilisation de protéines ou de complexes protéiques qui ne sont habituellement pas ou peu SUMOylés. La dynamique de conjugaison/déconjugaison rapide de SUMO apparaît donc comme primordiale pour la survie des cellules en réponse au stress. Adapté de *Hendriks and Vertegaal, 2016*.

Bien que le mécanisme de réponse au stress par la SUMOylation reste encore peu clair, la régulation des enzymes de désSUMOylation semble jouer un rôle majeur. Prenons l'exemple du choc thermique auquel la SUMOylation est très sensible. Toutes les désSUMOylases à l'exception de Senp6 sont thermosensibles, c'est-à-dire qu'elles sont inactivées en réponse à une hausse excessive de température. L'inactivation des SENPs expliquerait alors l'augmentation massive de la SUMOylation observée lors d'un choc thermique (Golebiowski et al., 2009; Pinto et al., 2012). De plus, il a été montré que lors d'un choc thermique, la SUMOylation de la sous-unité E1 Sae2 augmente. Or, la modification de Sae2 par SUMO diminue son efficacité. Il serait donc possible que Senp6 ne soit pas thermosensible afin de pouvoir désSUMOyler la sous-unité E1 et favoriser le bon déroulement du cycle de SUMOylation (Truong et al., 2012).

Le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provoque également des changements dans les niveaux globaux de SUMOylation, mais ceux-ci s'avèrent plus complexes, et finement régulés. En effet, la réponse est très dépendante de la concentration en espèces oxygénées activées (ROS : « *Reactive oxygen species* »). À des concentrations faibles, la SUMOylation est réduite et différentes protéines jouant un rôle central dans la réponse au stress oxydatif sont désSUMOylées, vraisemblablement *via* l'inactivation transitoire des

enzymes SUMO E1 et E2 due à la création d'une liaison disulfure entre les résidus cystéines de leurs domaines catalytiques. A des concentrations élevées, l' H_2O_2 augmente la conjugaison de SUMO, probablement *via* l'inactivation de Senp1 (Huang et al., 2009; Bossis and Melchior, 2006).

4. SUMO et cancer

Comme nous venons de le voir, la SUMOylation est impliquée dans de nombreuses fonctions et voies de signalisation essentielles à la cellule. Il n'est donc pas étonnant qu'un défaut de la voie SUMO puisse conduire au développement de maladies, dont le cancer. L'implication de SUMO dans la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose et le potentiel métastatique *via* la régulation d'oncoprotéines, en fait un acteur important dans l'oncogenèse. De plus, la SUMOylation a un rôle prépondérant dans la réponse aux dommages à l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, et la sénescence (**Figure 18**). Enfin, comme nous l'avons décrit dans la section précédente, SUMO régule le stress cellulaire, ce qui pourrait expliquer sa surexpression lors de la tumorigène au cours de laquelle la cellule subit de nombreux stress. (Seeler and Dejean, 2017).

Le premier lien entre SUMO et cancer a été établi lors de la découverte d'un des premiers substrats de SUMO : la protéine hybride PML-RAR α (« *promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha* ») qui provient de la juxtaposition des gènes codant pour la protéine PML et RAR α (« *Retinoic acid receptor- α* ») suite à une translocation chromosomique (Sternsdorf et al., 1997; Müller et al., 1998). L'oncoprotéine PML-RAR α est associée une maladie hématologique rare aux conséquences graves, la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) (de Thé et al., 1991). En effet, PML est la composante principale de domaines subnucléaires appelés corps nucléaires PML dont l'intégrité dépend de la SUMOylation de la protéine PML (Zhong et al., 2000). Dans le cadre de la LAP, ces structures se trouvent gravement perturbées dans les blastes exprimant la protéine chimère PML-RAR α . La thérapie ciblée utilisée pour traiter les patients consiste en l'association de l'acide rétinoïque et de l'arsenic, provoquant la dégradation de PML-RAR α . En effet, le traitement induit l'hyper-SUMOylation de cette protéine hybride, ce qui conduit au recrutement de Rnf4 et à sa dégradation par le protéasome, comme décrit précédemment (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008). Cela entraîne la restauration des corps PML et la rémission complète d'une grande majorité des patients (Tallman and Altman, 2009).

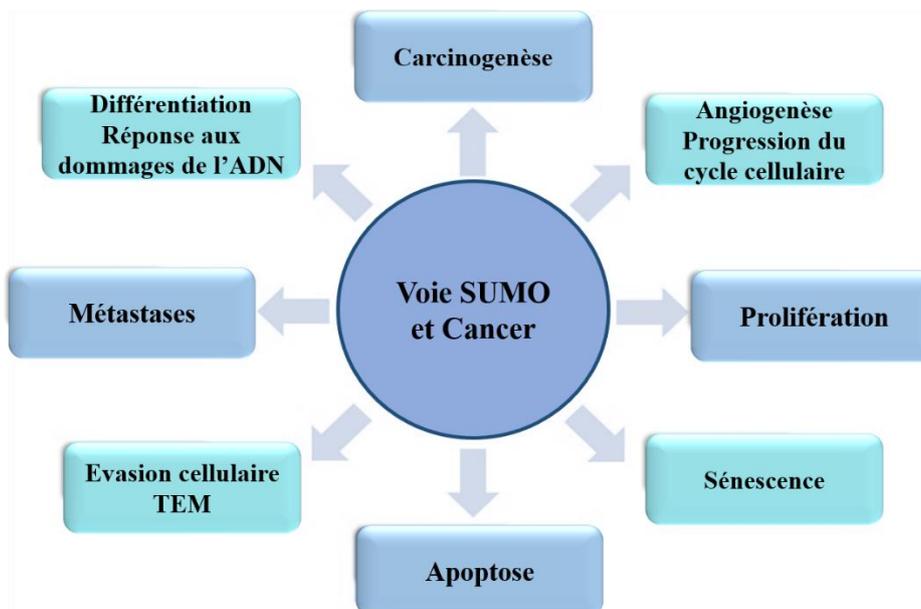


Figure 18 : Implication de la voie SUMO dans le cancer.

La SUMOylation a un rôle important dans la signalisation des cellules cancéreuses et les réseaux de gènes qui régulent l'inflammation, l'immunité et les dommages à l'ADN, ce qui impacte la cancérogenèse, la prolifération, les métastases et l'apoptose. TEM= Transition épithélio-mesenchymateuse. Adapté de *Han et al., 2018*.

Bien que la SUMOylation de PML–RAR α soit le meilleur exemple pour illustrer les succès du ciblage de la voie SUMO dans le cancer, cette modification affecte de nombreux suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes (**Figure 19**). Le nombre de substrats de SUMO liés au cancer ne cesse d'augmenter, mais le mécanisme d'action de la modification par SUMO dans l'évolution et l'initiation tumorale mériterait d'être étudié plus en détail.

SUMO substrate	Canonical function	Cancer (model)	Sumoylation role or mechanism
Tumour suppressor			
p53	Transcription factor	Various cell lines	Contingent upon monoubiquitylation, sumoylation contributes to nuclear export and attenuation of transcriptional activity
		Various cell lines	Inhibition of subsequent acetylation and DNA binding, reduced transcriptional activity
		Various cell lines	Generally mildly enhanced or attenuated transcriptional activity in reporter assays
RB	Transcriptional repressor of S phase genes	Various cell lines	Reduced transcriptional repression by hypophosphorylated form of RB
PTEN	PIP ₃ phosphatase	Prostate cancer (PC3 cell line mouse xenograft)	Suppression of anchorage-independent and tumour xenograft growth by enhanced PTEN membrane association and downregulation of PI3K–AKT signalling upon abrogation of PTEN sumoylation
		Colon cancer (HCT116 cell line mouse xenograft)	Essential for nuclear retention of PTEN, critical for DNA repair signalling
pVHL	E3 ubiquitin ligase	Renal cell carcinoma (RCC4 and 786-0 cell lines)	pVHL oligomerization via PIAS4-mediated sumoylation, leading to enhanced HIF1 α stabilization, proliferation, migration and clonogenicity
BRCA1	E3 ubiquitin ligase	Various breast and ovarian cancer cell lines	Enhances ubiquitin ligase activity in DNA double-strand break repair
Oncoprotein			
MYC	Transcription factor	Osteosarcoma (U2OS cell line)	Poly- or multi-sumoylation-mediated degradation via RNF4 and possibly other StUbls
MDM2	E3 ubiquitin ligase for p53	Colon and prostate cancer (HCT116 and LnCaP cell lines)	SKI enhances MDM2 sumoylation and activity leading to p53 destabilization
		Various cell lines	UV-induced desumoylation enhances MDM2 self-ubiquitylation, leading to p53 stabilization
β -Catenin	Transcription factor	Multiple myeloma (RPMI-8226 and NCI-H929 cell lines)	Stabilization of β -catenin, enhanced WNT– β -catenin signalling, survival and proliferation
Reptin (also known as RUVBL2)	Transcriptional repressor	Prostate cancer (LnCaP cell line)	Enhanced reptin-mediated transcriptional repression of metastasis inhibitor KAI1 (also known as CD82), leading to enhanced invasive capacity <i>in vitro</i>
Cyclin D1	G1/S cell cycle regulator	Mouse embryonic fibroblasts	Bypass of RAS oncogene-induced senescence by enhanced nuclear accumulation of SUMO-modified cyclin D1
Oncogenic fusion protein			
PML–RAR α	Nuclear body protein and nuclear receptor transcription factor fusion	APL	Arsenic-induced hypersumoylation and StUbl- (RNF4-) mediated degradation leading to PML nuclear body restoration and apoptosis associated with clinical remission in patients

Figure 19 : Exemples de suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes modifiés par SUMO.

HIF1 α = « *Hypoxia-Inducible Factor 1 α* »; PIP3 = « *Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate* »; pVHL = « *Von Hippel–Lindau protein* »; RB = « *Retinoblastoma protein* »; UV = « *UltraViolet* ».
Adapté de Seeler and Dejean, 2017.

La voie SUMO peut également être dérégulée dans un contexte tumoral. La SUMOylation étant essentielle, les mutations affectant cette voie sont rares et font office d'exceptions. On peut citer quelques cas de polymorphismes germinaux du gène codant Ubc9 (c.73G>A (rs11553473), c.430T>G (rs75020906), g.1289209T>C (rs7187167)) associés à un risque légèrement accru du cancer du sein ainsi qu'à un pronostic moins favorable (Dünnebier et al., 2010; Synowiec et al., 2010). Dans le cadre des altérations somatiques, on a décrit un cas

de translocation chromosomique retrouvé chez un patient atteint de tératome infantile et un cas de chimérisme dans une lignée cellulaire de leucémie lymphoblastique, impliquant respectivement les désSUMOylases Senp1 et Senp6 (Veltman et al., 2005; Tagawa et al., 2002). La dérégulation de la voie SUMO dans le cancer correspond majoritairement à une surexpression des composants de cette voie menant à une SUMOylation accrue associée la plupart du temps à un mauvais pronostic. Ainsi, la surexpression de la sous-unité Sae2 semble favoriser la progression du cancer gastrique, la surexpression d'Ubc9 est associée à un stade avancé de mélanome et semble induire une résistance à la chimiothérapie, tandis que la surexpression de l'enzyme E3 ligase Cbx4 (« *ChromoBoX 4* ») favorise l'angiogenèse et la progression du carcinome hépatocellulaire dans un modèle murin (Li et al., 2014; Moschos et al., 2007; Shao et al., 2014). Dans certains cancers, il a été montré que la SUMOylation est augmentée, tout comme l'expression de désSUMOylases. Cela peut sembler *à priori* paradoxal, mais pourrait suggérer la nécessité d'un renouvellement accéléré de SUMO.

Etant donné l'implication de la SUMOylation dans le cancer, le ciblage de cette voie pourrait être d'un grand intérêt thérapeutique (pour revue (Kroonen and Vertegaal, 2021; Yang et al., 2018)). Par exemple, il a été montré que l'inhibiteur ML-792 pourrait potentiellement être utilisé dans les tumeurs où le pro-oncogène MYC est amplifié (He et al., 2017). En effet, le traitement de différentes lignées cellulaires avec cet inhibiteur induit de forts défauts mitotiques, conduisant à leur apoptose et il affecte préférentiellement la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses surexprimant MYC.

Pour finir, de nombreuses études ont mis en évidence la contribution de l'inflammation au développement du cancer. La voie NFκB joue notamment un rôle central dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives ainsi que dans le développement et la progression du cancer (Karin, 2006). Or, SUMO est un régulateur important de la voie NFκB et plus généralement de l'inflammation et de la réponse immunitaire anti-tumorale. Cela constituera le sujet de notre prochaine section.

III. SUMO et immunité anti-tumorale

A. Introduction à l'immunité anti-tumorale

Le terme « immunité anti-tumorale » aussi appelé « immunosurveillance anti-tumorale », fait référence aux réponses immunitaires innées et adaptatives qui contrôlent le développement et la progression du cancer. Bien que ce concept soit aujourd'hui accepté et très largement étudié et documenté par la communauté scientifique, le lien entre immunité et cancer a été sujet de controverses tout au long du XXème siècle. L'hypothèse d'une possible reconnaissance et élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire était porteuse d'espoir pour les thérapies anti-tumorale, mais les connaissances encore très limitées dans le domaine de l'immunologie et l'oncologie menèrent parfois à des expériences infructueuses qui engendrèrent du désenchantement, voir du scepticisme (Parish, 2003).

On situe généralement les premières observations établissant un lien entre le système immunitaire et le cancer à la fin du XIXe siècle avec le travail de William B. Coley en 1890. Or, les débuts de l'immunité anti-tumorale, bien que n'étant pas encore considérés comme tel, peuvent être attribués au physicien Rudolf Virchow dès 1863. Il est le premier à établir un lien entre l'inflammation et le cancer suite à l'observation de leucocytes sur des sites tumoraux (Virchow, 1863). Les travaux du Dr. Coley constituent les premières preuves de la possibilité de se servir du système immunitaire contre le cancer. Coley consacra une grande partie de sa vie à la recherche de traitements contre les cas graves de sarcomes. Un cas en particulier retint son attention. Il s'agissait d'un patient atteint de sarcome au niveau du cou et du visage, et étant en totale rémission à la suite de deux infections aiguës causées par la bactérie *Streptococcus pyogenes*. Coley continua ses recherches et recensa d'autres cas semblables. Il décida donc d'inoculer des patients atteints de sarcomes incurables avec des préparations de streptocoques, et observa des régressions tumorales chez certains d'entre eux, associées à une rémission plus ou moins longue (Coley, 1991). Coley traita plus de 900 patients cancéreux avec sa préparation bactérienne améliorée, qui resta connue sous le nom de « *Coley's toxin* ». Son traitement aboutissait à un taux de rémission complète de 10% chez des patients considérés comme condamnés et peut être considéré comme les débuts de l'immunothérapie (Parish, 2003; Wiemann and Starnes, 1994). Cette première tentative d'immunothérapie rencontra néanmoins le scepticisme de la communauté scientifique et fut vite abandonnée et remplacée par la

radiothérapie présentant des résultats moins aléatoires et des effets secondaires moins drastiques. Ces expériences restent toutefois fondatrices et déclenchèrent un certain intérêt. Les découvertes qui en découlent nous mènent aujourd'hui à considérer l'immunothérapie de la même manière que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Les travaux de Coley ont, entre autres, menés à l'utilisation du vaccin BCG (bacille de Calmette et Guérin) comme traitement du cancer de la vessie. En effet, Albert Calmette et Camille Guérin développèrent un vaccin qui se révéla efficace contre la tuberculose et le nommèrent BCG de leurs deux noms (Calmette, 1931). En 1929, Raymond Pearl et Amer Hyg observèrent une incidence moindre de cancer chez les patients atteints de tuberculose. Il faudra attendre trois décennies pour obtenir des preuves de l'action anti-tumorale du BCG chez la Souris, puis une décennie supplémentaire pour obtenir des résultats cliniques satisfaisants menant finalement à l'utilisation du BCG comme traitement du cancer superficiel récidivant de la vessie (Old et al., 1959; Mathé et al., 1969; Morales et al., 1976). Cette immunothérapie demeure encore le traitement standard le plus efficace pour cette pathologie.

En 1909, Paul Ehrlich postula que l'incidence des cancers augmentait en absence de système immunitaire et introduit le concept de l'immunosurveillance anti-tumorale, hypothèse qui sera reprise 50 ans plus tard par Lewis Thomas et Frank Burnet. En plus de l'idée que le système immunitaire serait capable de reconnaître des cellules cancéreuses et de prévenir la formation de tumeurs, ils suggérèrent l'implication des lymphocytes T comme acteurs principaux de l'immunité anti-tumorale. De nombreux modèles expérimentaux utilisant des souris syngéniques appuyèrent cette hypothèse (Mitchison, 1955; Prehn and Main, 1957). L'approche expérimentale classique consistait à exciser une tumeur d'un animal et à montrer que, dans de nombreux cas, les animaux pouvaient rejeter une seconde fois les mêmes cellules tumorales après injection ou transplantation. D'autres expériences impliquaient le transfert de lymphocytes isolés de souris ayant rejetées la tumeur et montraient la résistance de l'hôte au développement de tumeurs. Ces travaux ont permis de démontrer l'existence d'antigènes associés aux cellules tumorales (TAA : « *Tumor-associated antigen* ») et pouvant être reconnus par le système immunitaire. La notion d'« immunosurveillance » fait donc référence aux lymphocytes contrôlant continuellement les tissus et éliminant les cellules transformées, vraisemblablement par la reconnaissance des TAAs. Si les années qui suivent ont été riches en découvertes sur les TAAs et menèrent au développement d'anticorps monoclonaux en tant qu'immunothérapies, le concept d'immunosurveillance est loin d'être accepté et reste sujet à controverse, principalement dû au fait que le domaine de l'immunologie n'en est qu'à ses

prémices et que le modèle est encore incomplet. Les expériences sur modèles murins mènent à des résultats parfois contradictoires par rapport au concept d'immunosurveillance, comme c'est le cas des premiers travaux réalisés sur les souris *Nude* (Grant and Miller, 1965; Stutman, 1974). En effet, en 1974, Stutman observe une incidence et un temps moyen d'apparition de tumeurs induits par un agent chimique identiques chez des souris sauvages et des souris *Nude* athymiques et déficientes en lymphocytes T. La validité des expériences de Stutman sera remise en question bien plus tard, mettant en lumière le fait que les souris *Nude* possèdent un système immunitaire inné complet et fonctionnel (Maleckar and Sherman, 1987).

De nouveaux modèles murins plus adaptés à l'étude de l'immunité apparaissent, faisant suite au développement de techniques d'inactivation de gènes ciblées (Koo et al., 2009). En utilisant de tels modèles, Schreiber montre que des cellules tumorales mutées peuvent être sélectionnées positivement sous la pression du système immunitaire ce qui aboutit à un échappement à l'immunosurveillance. Ainsi, seules les cellules tumorales les moins immunogènes survivraient, et entraîneraient la formation d'une tumeur (Urban et al., 1982; Dighe et al., 1994). Ces résultats ont permis d'introduire un nouveau concept : « l'immunoediting » aussi connu sous le nom de « la théorie des 3E » pour « Elimination, équilibre, échappement ». La phase d'élimination correspond à la notion d'immunosurveillance, les cellules tumorales sont éliminées par le système immunitaire. Lors de la phase d'équilibre survient le phénomène « d'*immunoediting* » où les cellules non-éliminées subissent un processus de révision leur permettant de passer inaperçues et menant à un état d'équilibre. Enfin, lors de la phase d'échappement tumoral, les cellules transformées échappent à la surveillance immunitaire par divers mécanismes (Dunn et al., 2002, 2004). Nous reviendrons plus en détail sur cette notion lors de la section suivante.

L'immunothérapie a connu un essor spectaculaire ces 20 dernières années, et il serait vain d'en citer toutes les innovations. Nous décrirons donc uniquement le principe des immunothérapies principalement employées à ce jour, après avoir introduit plus en détail les concepts sur lesquels elles reposent.

B. Immunité anti-tumorale naturelle

1. Les sceaux du cancer

La tumorigenèse est un processus complexe qui comporte de multiples étapes menant à la formation d'une tumeur. Cette progression repose sur l'acquisition séquentielle d'anomalies génétiques et épigénétiques conférant à terme un avantage sélectif de prolifération et de survie cellulaire. Ces avantages constituent les six caractéristiques biologiques initiales définies comme inhérentes aux cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces propriétés permettent de définir un cadre rationnel de l'organisation tumorale, facilitant ainsi la compréhension de ces pathologies complexes. Ces caractéristiques comprennent le potentiel de réplication illimité, l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à l'apoptose, l'induction de l'angiogenèse et l'activation des processus d'invasion et de métastases (**Figure 20**).

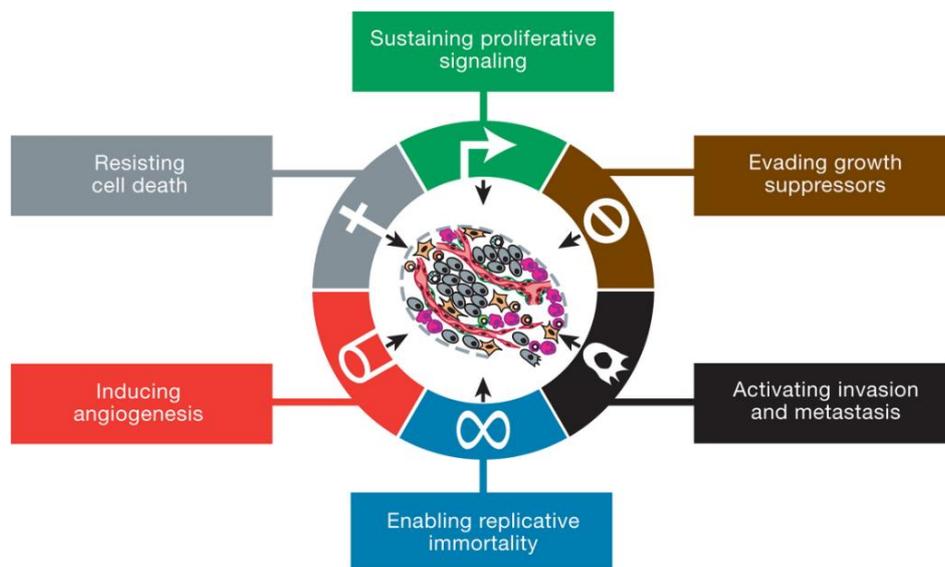


Figure 20 : Les six sceaux du cancer.

De Hanahan and Weinberg, 2000.

Les connaissances acquises au cours des années suivantes ont permis à Hanahan et Weinberg de compléter les caractéristiques de la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg, 2011). Ils ont ainsi mis en évidence que les six propriétés du cancer préalablement définies reposaient sur deux principaux éléments initiateurs : l'instabilité génomique menant à des mutations aléatoires et la présence d'une inflammation chronique par le système immunitaire. Deux autres caractéristiques ont par ailleurs été incluses dans la liste des sceaux du cancer : la

reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement de la tumeur au système immunitaire (**Figure 21**). Cette dernière propriété joue un rôle primordial dans le concept de l'« *immunoediting* » dont nous allons discuter dans la section suivante.

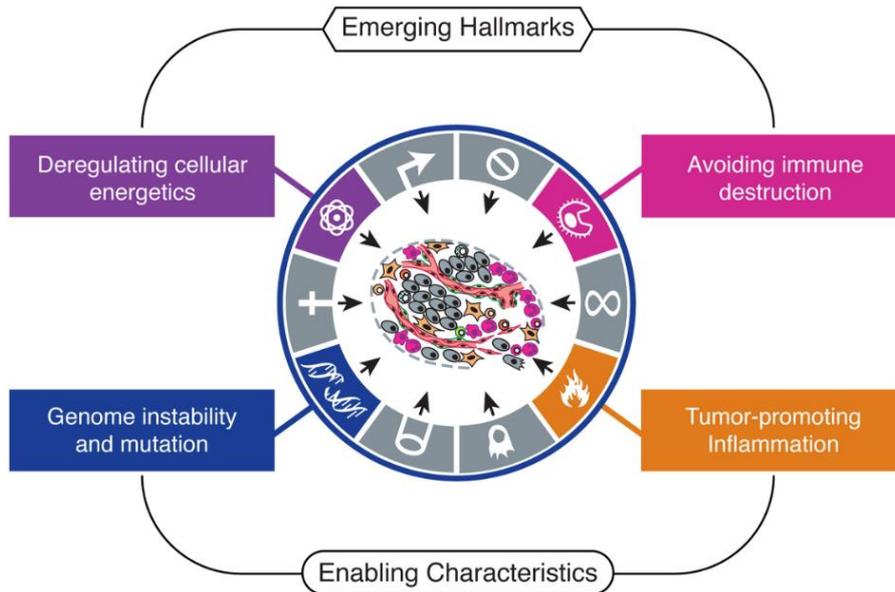


Figure 21 : Actualisation des sceaux du cancer.

De Hanahan and Weinberg, 2011.

2. L' « immunoédition » ou la « théorie des 3E »

Comme évoqués précédemment, les nouveaux concepts acquis à la fin du XX^{ème} Siècle ont démontré que le système immunitaire peut paradoxalement contraindre et favoriser le développement et la progression de la tumeur. Ces connaissances donnent lieu au concept d'« immunoédition » du cancer ou « théorie des 3E ». Sous sa forme la plus complexe, il se déroule en trois phases, appelées élimination, équilibre et échappement (**Figure 22**).

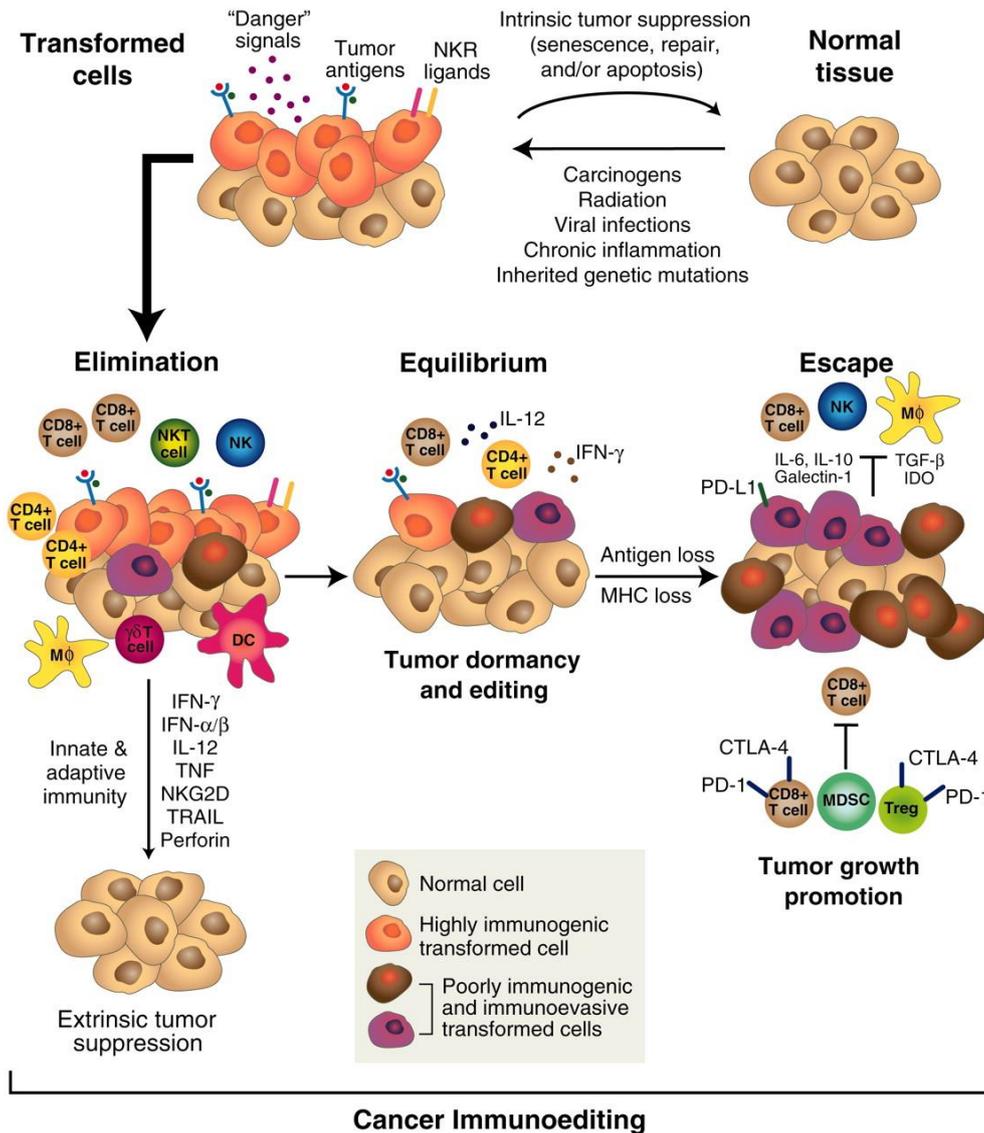


Figure 22 : Le concept d'immunoédition du cancer.

L'immunoédition du cancer se compose de trois phases séquentielles : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Ces trois phases sont précédées par l'induction d'une inflammation due à l'apparition de cellules malignes transformées. Le recrutement des cellules du système immunitaire inné et adaptatif permet l'élimination des cellules tumorales par des mécanismes variés. Cependant, si toutes les cellules tumorales n'ont pas été éliminées, elles peuvent alors entrer dans la seconde phase lors de laquelle elles entrent en quiescence, conduisant à un état d'équilibre avec le système immunitaire. Cet équilibre pouvant durer des années, il marque parfois la fin du processus tumoral. Cependant, en raison de la pression constante de sélection immunitaire exercée sur les cellules tumorales maintenues en équilibre, des variantes de cellules tumorales peuvent émerger et échapper au système immunitaire. Ces mécanismes d'échappement mènent à terme au développement d'une tumeur. De *Schreiber et al., 2011*.

a) La phase d'élimination

La phase d'élimination reprend le concept d'immunosurveillance selon lequel l'immunité adaptative et innée coopéreraient afin d'identifier et éliminer les cellules transformées. Lorsqu'elle aboutit à l'éradication de toutes les cellules tumorales, elle peut mener à la fin du processus d'immunoédition.

(1) Effecteurs de l'immunité innée

De la même manière que lors d'une agression externe à l'organisme, la réponse immunitaire innée constitue la première ligne d'attaque lors de la phase d'élimination du cancer. Lors du développement tumoral, un environnement pro-inflammatoire est généré par la libération de signaux moléculaires de danger nommés DAMP (« *Damage Associated Molecular Pattern* »). Ce contexte favorise le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité innée qui vont reconnaître et détruire les cellules tumorales tout en libérant des chimiokines et de l'IFN γ (interféron γ). Cela donne lieu à une cascade de réactions aboutissant au recrutement et à l'activation de nouveaux effecteurs de l'immunité.

Ses effecteurs principaux sont les NK (« *Natural killer* »), les NKT (« *Lymphocytes T Natural Killer* »), les lymphocytes T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$), les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles ainsi que les cellules dendritiques (DC) et les monocytes/macrophages qui sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

L'action du système immunitaire innée repose sur sa capacité à différencier les cellules saines des cellules tumorales. Outre la surexpression de protéines membranaires atypiques, une des caractéristiques des cellules tumorales correspond à la présence de lésions génotoxiques. Or, les dommages à l'ADN impliquant les voies ATM (« *ataxia telangiectasia mutated* »), ATR (« *ataxia telangiectasia and Rad3 related* »), Chk-1 et Chk-2 (« *Checkpoint kinase 1/2* ») induisent l'expression des ligands NKG2D, qui comprennent entre autres les molécules liées au CMH de classe I, MicA et MicB (« *MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B* »), ainsi que six protéines de liaison U116 chez l'Homme (Gasser et al., 2005). L'expression en surface de ces ligands déclenche l'activation NKG2D-dépendante des cellules NK, NKT et T $\gamma\delta$ qui vont venir inhiber la croissance tumorale par des mécanismes que nous décrirons postérieurement.

L'action des cellules NK est particulièrement documentée du fait de leur activité anti-tumorale directe ou dépendante de l'anticorps (ADCC : « *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* ») (Iannello et al., 2016). Les cellules NK expriment simultanément divers récepteurs inhibiteurs ou activateurs qui peuvent fonctionner avec une certaine indépendance les uns des autres et dont l'équilibre stœchiométrique contrôle l'activation. Parmi ces récepteurs, on peut citer NKG2D qui reconnaît des protéines de la famille MIC (« MHC class I Chain-related protein »), homologues au CMH-I et surexprimés par des cellules stressées ou transformées. Les NK expriment de nombreux autres récepteurs dont les récepteurs de cytotoxicité naturelle NKp46, NKp44, NKp30 et NKp80 impliqués dans la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales et la prévention des métastases (Andrews et al., 2012; Raulet and Guerra, 2009).

En plus de leur rôle anti-tumoral direct, les NK agissent comme une interface entre l'immunité innée et adaptative par la sécrétion d'IFN- γ qui stimule les monocytes/macrophages et les DCs ainsi que par la sécrétion de GM-CSF (« *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* ») qui contrôle la prolifération, la différenciation et l'activation des monocytes et des granulocytes (Gonzalez et al., 2018).

Les NKT sont des cellules particulières qui expriment certains marqueurs des cellules T mais aussi des NK. Ces cellules présentent un répertoire de TCR (« *T cell receptor* ») restreint et ont la particularité de reconnaître les glycolipides présentés par CD1d (« Cluster de différenciation 1 »), une molécule analogue aux molécules de CMH-I et exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules tumorales. A l'instar des cellules NK, les NKT sont impliquées dans l'activation des autres effecteurs immunitaires *via* la sécrétion de cytokines et la lyse tumorale *via* une activité cytotoxique (Bae et al., 2019).

Les cellules T $\gamma\delta$ ont un rôle majeur mais souvent sous-estimé dans la surveillance immunitaire des tumeurs, rôle qui a été établie dans divers modèles précliniques de cancer. Tout comme les lymphocytes T $\alpha\beta$, les cellules T $\gamma\delta$ possèdent des fonctions effectrices cytotoxiques et produisent des cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, les T $\gamma\delta$ ont la capacité de reconnaître les cellules tumorales par le biais de leur récepteur de cellules T ou de récepteurs de cellules NK, notamment NKG2D, sans être dépendants des molécules du CMH couplés à un antigène (Silva-Santos et al., 2019; Vermijlen et al., 2018).

Une autre composante majeure de la réponse cellulaire anti-tumorale est mise en œuvre par les macrophages qui, du fait de leur abondance et de leur plasticité, régulent de nombreuses et diverses fonctions immunitaires. Lors de la progression tumorale, des cellules précurseurs monocytaires présentant des stades plus ou moins avancés de différenciation migrent au niveau de la tumeur. Suite aux différents signaux générés par le microenvironnement tumoral, ces cellules se différencient en macrophages matures et acquièrent différents profils d'expression enzymatiques, de cytokines et de marqueurs de surface cellulaires qui vont définir deux grandes catégories : les macrophages M1 dits « classiques » et M2 dits « alternatifs » (Biswas et al., 2006). Les macrophages sont, en effet, ambivalents vis-à-vis de la tumeur : les macrophages M1 sont impliqués dans la réponse inflammatoire, l'élimination des pathogènes et l'immunité antitumorale et les macrophage M2 exercent des fonctions anti-inflammatoires et pro-tumorigènes (Sica et al., 2008). Les macrophages associés aux tumeurs (TAM : « *Tumor-associated macrophage* ») présentent en général un profil M2 associé à une production d'IL-10 qui entraîne un environnement immunosuppresseur (Sica et al., 2006). Toutefois, il est important de noter que la réalité est plus complexe et que cette dichotomie M1/M2 correspond à un spectre de phénotypes qui varient selon les types de tumeurs. De plus, il semblerait que lors des stades précoces de la tumorigenèse les macrophages infiltrants la tumeur soient de type M1 et voient par la suite leur phénotype évoluer vers un type M2 pro-tumorigène favorisant l'échappement tumoral (Kim and Bae, 2016; Mantovani et al., 2002). C'est pourquoi la réinitialisation des cellules M2 vers le phénotype M1 est étudiée pour l'immunothérapie du cancer (Deligne et al., 2020; Tan et al., 2018).

Pour finir, les cellules dendritiques sont des acteurs-clefs de la réponse immunitaire anti-tumorale, et plus particulièrement de l'interface entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Elles sont classées en DC dites « conventionnelles » (cDC), en DC plasmacytoïdes (pDC) et en DC monocytes (moDC) ayant chacune des fonctions particulières (Kuhn et al., 2015; Merad et al., 2013). Les cDC présentent les antigènes aux cellules T naïves et peuvent être séparées en cDC1 et cDC2, selon leur spécialisation respective dans la présentation d'antigène médiée par le complexe d'histocompatibilité de classe I et de classe II. Les pDC sécrètent quant à elles des niveaux élevés d'interféron de type I dont l'effet anti-tumoral est bien connu et que nous décrirons plus tard. Les moDC possèdent des fonctions effectrices *via* leur production de cytokines TNF- α et IL-12 ainsi que par cytotoxicité directe *via* la production d'oxyde nitrique synthase (NOS) (Serbina et al., 2003). Si le rôle des moDCs, pDCs et cDC2 dans l'immunité anti-tumorale restent encore peu étudiés, celui des cDC1 est bien défini comme

étant majeur, notamment grâce à la présentation antigénique aux cellules T cytotoxiques, dont nous allons parler dans la partie suivante.

(2) Effecteurs de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est spécifique, elle se développe au fil du temps par exposition à des antigènes dits « non-soi ». Dans le cas de l'immunité anti-tumorale, il s'agit de néoépitopes générés par une mutation ou des aberrations transcriptionnelles lors du processus tumoral, les premiers néoépitopes tumoraux ayant été identifiés dans les années 1980 (Plaen et al., 1988; Stauss et al., 1986). Comme nous venons de le voir, les effecteurs de l'immunité innée jouent un rôle majeur dans l'activation et le recrutement des effecteurs de l'immunité adaptative, notamment *via* la présentation des antigènes tumoraux et la production de cytokines et chimiokines. Les effecteurs de l'immunité adaptative dotés d'action onco-suppressive englobent les lymphocytes T auxiliaires qui stimulent les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) mais aussi les lymphocytes T auxiliaires (CD4+).

Les cellules T CD8 + constituent une sous-population des lymphocytes T exprimant le récepteur CD8 (cluster de différenciation 8), elles font parties des cellules ayant un des rôles les plus importants dans l'élimination des cellules tumorales. Le récepteur spécifique des lymphocytes T va venir reconnaître les antigènes présentés à la surface des cellules malignes ou des CPA par le CMH de classe I. Suite à cette reconnaissance et à une costimulation, les cellules naïves T CD8 + se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (CTL : « *cytotoxic T lymphocyte* ») et exercent une attaque anti-tumorale directe sur la cellules tumorales par l'exocytose de granules contenant des perforines et des granzymes (Matsushita et al., 2012). La présence de lymphocytes T CD8 + infiltrant les tumeurs (« *Tumor-Infiltrating Lymphocyte* », ou TIL) est un marqueur pronostic favorable dans de nombreux cancers (Fridman et al., 2012; Mahmoud et al., 2011)

Les cellules CD4 + « *T helper 1* » (Th1) constituent une autre catégorie de lymphocytes T reconnaissant les antigènes présentés par le CMH de type II. Ils sécrètent de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires favorisant l'activation et la cytotoxicité des CTLs mais aussi l'activité anti-tumorale des macrophages, des cellules NK, des DCs et des lymphocytes B (Hung et al., 1998; Tay et al., 2021).

Les cellules T résidente mémoire (Trm) CD8 et CD4 forment des sous-populations distinctes de cellules T localisées dans les tissus dont le rôle dans les contextes d'inflammation et d'infection est bien connu (Stary et al., 2015; Zammit et al., 2006). Moins étudiés, il semblerait toutefois que les Trm auraient une fonction essentielle dans la réponse immunitaire contre le cancer, leur présence est notamment associée à un meilleur pronostic dans plusieurs types de cancer (Koh et al., 2017; Mann et al., 2019; Savas et al., 2018).

(3) Mécanisme d'action anti-tumorale des effecteurs

Lors de la phase d'élimination, les différents acteurs présentés collaborent afin de détruire les cellules malignes. Les mécanismes par lesquels cela est rendu possible, en plus de différer d'un type de cancer à un autre, sont nombreux, variés et dynamiques. C'est pourquoi nous ne détaillerons que l'action de l'IFN-I. Les autres mécanismes sont présentés brièvement et de manière non-exhaustive dans le **Tableau 3**.

	Mode d'action	Conséquences	Cellules productrices
Action directe	Libération de perforine et de granzyme	Apoptose de la cellule tumorale	Cellules NK, CTLs
	Libération de FasL et TRAIL (“ <i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand</i> ”)	Apoptose de la cellule tumorale	Majoritairement les cellules NK et CTLs, dans une moindre mesure les CD4+ cytotoxiques et les neutrophiles N1
	Production d'espèces réactives oxygène/azote	Arrêt du cycle cellulaire, sénescence et apoptose de la cellule tumorale, induction d'une instabilité génétique et épigénétique	Macrophages M1, neutrophiles N1
	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type IFN-II (IFN- γ)	Apoptose de la cellule tumorale	NK, NKT, cellules T CD8 et CD4+ Th1
Action indirecte	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type IFN-I	Augmente la cytotoxicité des macrophages et des NK, la différenciation et l'activité des DCs, l'activation et la survie des CTLs, la prolifération des LT CD8+ mémoires et module la production de cytokines inflammatoires	pDCs, macrophages
	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type IFN-II (IFN- γ)	Polarisation des macrophages vers un phénotype M1, régule positivement l'expression du CMH-I, aide à la maturation des DCs, régule négativement l'angiogenèse et les T régulateurs, stimule la différenciation en CTLs	K, NKT, cellules T CD8 et CD4+ Th1
	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type TNF- α	Améliore la différenciation et l'activation des DCs, active la fonction cytotoxique des macrophages et des NK, inhibe l'angiogenèse, induit l'apoptose de la cellule tumorale	CTLs, macrophages M1
	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type interleukines (exemple de l'IL-12)	Favorise le développement des NK, augmente la production d'IFN- γ par les DCs et les macrophages, ainsi que la sécrétion de cytokines par les cellules T et NK, aide à la réponse des CTLs	DCs, macrophages et cellules B
	Sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires (exemple de CCR5)	Améliore la maturation des DCs et permet leur migration à la tumeur, nécessaire pour l'activation et la migration des CD8+ au site tumoral	Cellules T CD4+ et CD8+, macrophages
	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	Lyse ciblée de la cellule tumorale dû à la liaison d'anticorps	Cellules NK, T $\gamma\delta$, neutrophiles N1

Tableau 3 : Mécanisme d'action anti-tumorale des effecteurs de l'immunité innée et adaptative.

Belardelli, 2002; Kohli et al., 2021; Lafont et al., 2014; Lei et al., 2020; Rahat and Hemmerlein, 2013; Rawat et al., 2021; Rossin et al., 2019; Song et al., 2019

Les IFN de type I sont une famille de cytokines comprenant, chez l'Homme et la Souris, l'IFN- α (une classe de protéines homologues codées par 13 gènes distincts *Ifna1* à *Ifna13*), l'IFN- β (codé par le gène *Ifnb1*) ainsi que l'IFN- ϵ , l'IFN- κ et l'IFN- ω , que nous n'aborderont pas dans ce manuscrit. Ces cytokines sont rapidement induites suite à la reconnaissance par les « *Pattern Recognition Receptor* », ou PRR, de molécules conservées chez les virus et les bactéries telles que l'ARN double et simple brin, l'ADN riche en CpG et le lipopolysaccharide (LPS) (Fuertes et al., 2013). Les IFN-I partagent tous un récepteur hétérodimère IFN α/β composé des sous-unités *Ifnar1* et *Ifnar2* (« *Interferon- α/β receptor 1/2* ») dont l'activation va entraîner la voie de signalisation JAK-STAT et induire l'expression de centaines de gènes stimulés par l'IFN (ISG : « *Interferon-stimulated gene* ») (**Figure 23**). Ces ISGs jouent un rôle important dans la réponse immunitaire de l'hôte aux bactéries, aux virus, et aux maladies fongiques ainsi que dans l'inflammation.

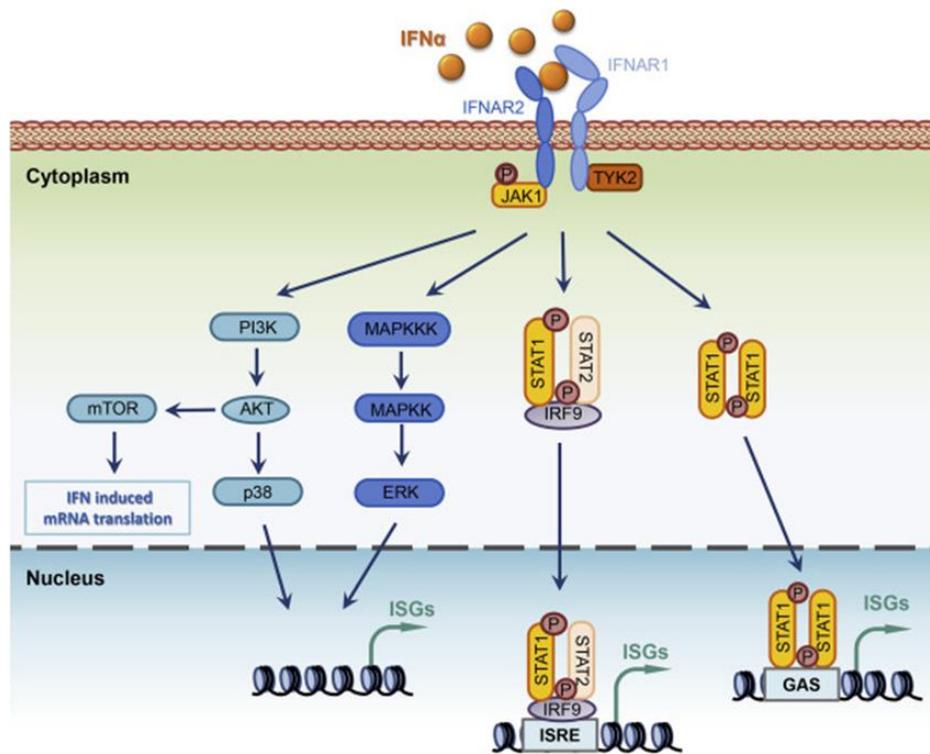


Figure 23 : Voies de signalisation de l'IFN-I.

Dans la voie canonique, l'IFN se lie au récepteur *Ifnar* entraînant la phosphorylation de JAK1 et TYK2, qui vont recruter les protéines STATs. ISGF3, un complexe formé par Stat1, Stat2 et Irf9, se lie au motif ISRE (« *interferon-stimulated response element* »), menant à l'induction de centaines de gènes ISG. Un autre complexe formé par les homodimères Stat1 reconnaît quant à lui le motif GAS et entraîne l'expression de gènes pro-inflammatoires. D'autres voies IFN non-canoniques induisent l'activation de

voies telles que les MAPK (« *Mitogen-activated protein kinase* »), PI3K (« *phosphoinositide 3-kinase* ») et mTOR (« *Mammalian target of rapamycin* »). De Chen et al., 2017.

Le premier lien entre l'interféron de type-I et l'immunité anti-tumorale a été établi en par Ion Gresser, il n'y a qu'une cinquantaine d'années (Gresser and Bourali, 1969). L'IFN- α est depuis devenu le premier médicament immunothérapeutique approuvé par la FDA (« *Food and Drug Administration* »), équivalent américain de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Il intervient, seul ou en combinaison, dans de nombreux traitements contre les cancers (Belardelli et al., 2002; Saven and Piro, 1992). Les études réalisées ces dernières années ont montré que la production et la réponse aux IFN-I jouent un rôle crucial dans la phase d'élimination tumorale (Chen et al., 2009; Tschurtschenthaler et al., 2014). Ainsi, la délétion d'*Ifnar1* et *Ifnar2* chez la Souris augmente l'incidence de fibrosarcomes (Dunn et al., 2005). Les IFN-I ont une action directe sur la cellule tumorale qui est notamment bien documentée pour l'IFN- α . Ces effets comprennent entre autre l'inhibition de la prolifération tumorale, l'apoptose de la cellule maligne, la favorisation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'induction de gènes suppresseurs de tumeurs ISG et la régulation négative d'oncogènes (Belardelli et al., 2002; Gresser et al., 1984; Kudryavets et al., 2011; Thyrell et al., 2002).

En plus de leurs effets directs, les IFN-I exercent un rôle sur des processus tels que l'angiogenèse ayant une fonction centrale dans le processus d'élimination tumoral. En effet, ils régulent négativement l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF : « *Vascular endothelial growth factor* ») ainsi que la prolifération des cellules endothéliales, inhibant donc l'angiogenèse (Indraccolo, 2010).

Un des rôles anti-tumoral les plus importants des IFN-I est leurs actions sur les cellules immunitaires innées et adaptatives, très étudiées ces vingt dernières années et résumées dans la **figure 24** (Boudreau et al., 2011; Eisenthal et al., 1990; Le Bon et al., 2001).

Ainsi, les IFN-I occupent-ils une place essentielle dans la phase d'élimination tumorale, mais aussi dans les phases d'équilibre et d'échappement comme nous allons le voir dans les parties suivantes. Cela fait d'eux des cibles parfaites pour les immunothérapies.

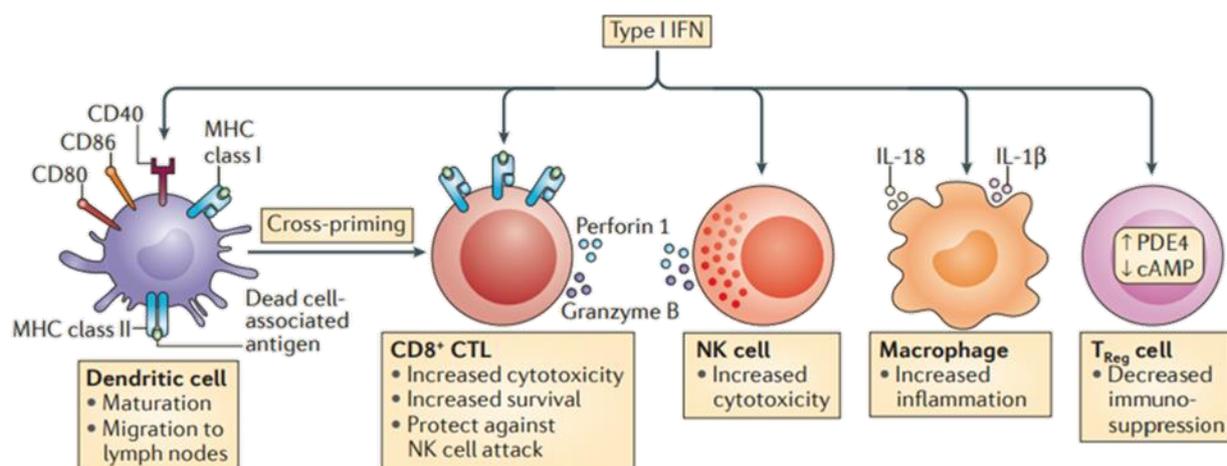


Figure 24 : Action de l'IFN-I sur les cellules immunitaires.

Les IFN-I interviennent dans la phase d'élimination par divers mécanismes : ils agissent à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif en favorisant la maturation et la migration des DCs et en améliorant leur capacité à présenter les antigènes tumoraux. De plus, les IFN-I renforcent les fonctions effectrices immunitaires en agissant sur les CTLs et les NK et stimulent la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. Enfin, ils peuvent inactiver la fonction suppressive des cellules T régulatrices (Treg) dont nous parlerons ultérieurement. PDE4 = « phosphodiesterase 4 », AMPc = AMP cyclique. Tiré de *Zitvogel et al., 2015*.

b) La phase d'équilibre

La phase d'élimination du cancer peut éradiquer toutes les cellules transformées et mener à la fin du processus tumoral. Cependant, il arrive que certaines cellules malignes résistent à cette phase et coexistent avec le système immunitaire de l'hôte pendant une phase de latence dite « d'équilibre ». Durant cette période, le système immunitaire, bien que dans l'incapacité d'éliminer complètement le cancer, ne lui permet pas non plus de progresser davantage. Cet équilibre peut durer des années et marquer la fin de l'évolution tumorale, mais permet aussi la sélection de variants tumoraux à la fois résistants à l'action des cellules immunitaires et plus agressifs. Les mécanismes associés à cet état sont peu compris et mal étudiés du fait de la difficulté de modéliser cette phase. Il semblerait toutefois que les lymphocytes et l'IFN- γ aient une fonction importante dans le maintien de la pression immunitaire sur les cellules malignes (Koebel et al., 2007). D'autres études rapportent un rôle de l'IFN-I dans l'état d'équilibre, comme l'indique l'association entre son expression dans le cancer du sein et un retard de croissance tumorale, d'invasion métastatique et une diminution de résistance à la chimiothérapie (Lan et al., 2019). Des preuves indirectes de cet état d'équilibre

ont été rapportées chez l'Homme, où deux patients ayant subis la transplantation d'un rein d'un même donneur en rémission d'un mélanome ont eux-mêmes été victimes de résurgences très agressives de ce même mélanome. Il semblerait que l'état d'équilibre des tumeurs chez le donneur ait été abolie par la prise de médicaments immunosuppresseurs (Elder et al., 1997). Lorsque ni la phase d'élimination, ni la phase d'équilibre ne marque la fin du processus tumoral, la tumeur entre alors dans la phase d'échappement.

c) La phase d'échappement

Lors de la phase d'évasion ou d'échappement, l'action des cellules immunitaires ne suffit pas à restreindre la croissance tumorale et la maladie devient alors cliniquement détectable.

L'établissement d'un environnement immunosuppresseur et, de manière générale, l'échappement tumoral, reposent sur le détournement de tous les mécanismes anti-tumoraux vu précédemment. Ainsi, l'immunogénicité amoindrie des cellules tumorales par le système immunitaire peut passer par la perte d'antigènes tumoraux, du CMH de classe I ou de molécules co-stimulantes mais aussi par l'expression de ligands inhibiteurs de la réponse immunitaire appelés « *checkpoints inhibitors* » ou inhibiteurs des points de contrôles dont nous détaillerons quelques caractéristiques ultérieurement. Les cellules tumorales peuvent de plus sécréter des cytokines immunosuppressives ou favorisant l'angiogenèse telles que TGF- β (« *transforming growth factor β* »), IL-6 et VEGF.

En outre, cette phase fait intervenir des acteurs clés de la régulation de l'immunité tels que les Treg, les MDSC (« *Myeloid-derived suppressor cells* ») ou cellules suppressives d'origine myéloïde et les macrophages de type M2 précédemment évoqués. Tandis que les Treg vont inhiber la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, ou l'IL-35 et l'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 (« *Programmed cell Death 1* ») et CTLA-4 (« *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* »), les MDSC produisent à des niveaux élevés de l'oxyde nitrique (NO) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène qui vont induire l'apoptose des cellules T (May et al., 2013; Mittal et al., 2014; Yang et al., 2020).

Les « *Immune Checkpoints* » (IC) ou points de contrôle immunitaires, sont une famille de récepteurs/ligands pouvant réguler les fonctions immunitaires par l'induction de signaux activateurs ou inhibiteurs. Ainsi, les souris dépourvues des points de contrôle immunitaires

CTLA-4 développent des maladies auto-immunes léthales survenant tôt après la naissance (Haanen and Robert, 2015). Une des stratégies d'échappement des cellules tumorales est de surexprimer certains ligands inhibiteurs afin de supprimer les réponses immunitaires anti-tumorales (Darvin et al., 2018). Ainsi, l'expression de ligands des IC inhibiteurs est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers tels que le mélanome ou le cancer du rein (Giraldo et al., 2015; Quereux et al., 2007).

Il existe de très nombreux IC inhibiteurs tels que CTLA-4, LAG-3 (« *Lymphocytes Activation Gene 3* ») ou TIM-3 (« *T-cell Immunoglobulin- and Mucin-domain-containing molecule 3* ») mais nous ne décrivons ici que l'action de PD-1.

PD-1 est un récepteur principalement exprimé à la surface des lymphocytes T activés. On le retrouve dans une moindre mesure à la surface de sous-populations de lymphocytes B et NK et de certaines cellules myéloïdes. Ses ligands sont PD-L1 (« *Programmed death-ligand 1* ») ou B7-H1 : « *B7 homolog 1* ») et PD-L2 exprimés à la surface de nombreuses cellules immunitaires (lymphocytes B, lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages) mais aussi de cellules stromales endothéliales et de cellules tumorales. L'engagement de PD-1 avec son ligand va venir inhiber certains facteurs de transcriptions essentiels pour la fonction des lymphocytes T tels que T-Bet et Gata3 ainsi que les signaux activateurs médiés par le TCR rendant ainsi le lymphocyte inefficace. On appelle ces lymphocytes « *exhausted T cells* », ils sont anergiques et majoritairement bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire. De plus, ce « *checkpoint inhibitor* » agit aussi sur l'immunogénicité de la tumeur en inhibant la production de perforine et de granzyme, en diminuant la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles que l'IFN- γ et le TNF- α , et en favorisant la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoires telles que l'IL-10. On comprend alors pourquoi une surexpression des ligands PD-L1/2 est retrouvée dans de nombreux cancers (Hargadon et al., 2018; Zou and Chen, 2008).

L'IFN-I, essentiel dans l'immunosurveillance, peut aussi être détourné par la cellule maligne afin d'échapper au système immunitaire. En effet, la voie des IFN-I est souvent dérégulée dans les cancers, menant à une baisse des niveaux d'IFN-I et de ses effets anti-tumoraux. Ainsi, une perte totale ou partielle du récepteur *Ifnar1* est observée dans adénocarcinomes colorectaux humains et est associée au développement et à la progression de mélanomes (Katlinskaya et al., 2016; Katlinski et al., 2017). De même, il a été montré que le miARN-21, surexprimé dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), peut induire une résistance

à l'IFN- α et que son expression était plus élevée chez les patients ne répondant pas à une combinaison d'IFN- α et de chimiothérapie (Tomimaru et al., 2010). Il a aussi été démontré que les IFN de type 1 régulent à la hausse l'expression de PD-L1 dans les cellules malignes, ce qui pourrait être favorable à leur évasion du système immunitaire (Bazhin et al., 2018). Toutefois, comme nous allons le voir, cet effet pro-tumoral apparaît paradoxalement comme bénéfique lors de l'emploi de certaines immunothérapies.

C. Induction de l'immunité anti-tumorale : immunothérapie

1. Définition

L'immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire ou à rendre la tumeur plus immunogène afin d'induire l'immunité anti-tumorale auparavant défaillante ou détournée par les cellules malignes. Elle peut être divisée en deux sous-catégories : passive et active. L'immunothérapie passive est utilisée chez les patients dont le système immunitaire est faible ou inactivé. Le traitement va donc consister à injecter des cellules ou molécules du système immunitaire produites *ex vivo* qui vont compenser les fonctions déficientes. Cette catégorie comprend l'administration de cytokines recombinantes, d'anticorps spécifiques aux tumeurs, et le transfert de cellules immunitaires pré-activées pour détruire les tumeurs, appelées des cellules « CAR » (« *chimeric antigen receptor* »). Les stratégies d'immunothérapies actives agissent sur le système immunitaire déjà présent afin d'en stimuler les fonctions effectrices. Cela comprend la vaccination à l'aide de peptides tumoraux ou de DCs autologues ainsi que l'administration d'anticorps dirigés contre les CI ou de virus oncolytiques générant une réponse immunitaire (Galluzzi et al., 2014; Zhang and Chen, 2018).

2. Classification et principe des immunothérapies

A l'instar de la chirurgie, la chimiothérapie, et la radiothérapie, l'immunothérapie est devenue un pilier standard du traitement du cancer. Ce domaine est en constante évolution ces dernières années, et a été mis en lumière par le prix Nobel de médecine 2018 obtenu par James P. Allison et Tasuku Honjo grâce à leurs travaux respectifs sur l'identification de PD-1 et CTLA-4 comme inhibiteurs de points de contrôle (Egen et al., 2002; Nishimura et al., 1999). Les principaux types d'immunothérapies sont résumés dans le **Tableau 4**.

	Type d'immunothérapie	Principe	Exemples
ACTIVE	Anticorps spécifiques de la tumeur (Monoclonal, bi- et tri-spécifique)	Action directe sur la tumeur par fixation de l'anticorps aux antigènes de la cellule maligne qui entraîne sa destruction par le système immunitaire ; action sur les cellules de l'immunité par signalisation positive aux effecteurs du SI (Système immunitaire) ou action indirecte par inhibition de signaux favorisant le développement et la propagation de la tumeur	Rituximab, anticorps monoclonal se liant à la protéine CD20 présente à la surface des cellules B immatures afin d'entraîner leur élimination par les NK Trastuzumab, anticorps monoclonal qui s'attache aux facteurs de croissances présents à la surface de certaines cellules de cancers du sein afin de les empêcher de se diviser
	Cytokines	Favorise la signalisation entre les cellules immunitaires ainsi qu'entre les cellules du SI et les autres cellules	IFN- α , inhibe la prolifération tumorale dans de nombreux cancers hématologiques et solides L'IL-2, augmente la production de lymphocytes T chez des atteints de cancers métastatiques
	Transfert adoptif de cellules	Modification <i>ex-vivo</i> de cellules immunitaires du patient afin de leur faire exprimer un récepteur chimérique spécifique d'antigènes tumoraux et ainsi reconnaître et détruire les cellules transformées	CAR-T contre la protéine CD19 dans les leucémies et les lymphomes, CAR-NK, CAR-NKT
PASSIVE	Vaccination anti-tumorale (Lysats cellulaires, cellules dendritiques, acides nucléiques, neoantigènes...)	Prévenir l'apparition de cellules tumorales ou apprendre aux cellules du système immunitaire à reconnaître et à tuer les cellules cancéreuses grâce au principe de vaccination	Vaccin contre le virus de l'hépatite B (VHB) et vaccin contre le virus du papillome humain (VPH), qui préviennent l'infection par ces virus cancérogènes Sipuleucel-T, vaccin de cellules dendritiques pour traiter le cancer de la prostate
	Virus oncolytiques	Injection de virus génétiquement modifié non-virulents mais capables de pénétrer et de lyser spécifiquement les cellules cancéreuses. La lyse des cellules malignes libère des molécules qui vont attirer et activer le SI	T-VEC, un virus de l'herpès simplex 1 exprimant le facteur de stimulation des granulocytes-macrophages (GM-CSF), une cytokine puissante qui attire de nombreux types de cellules immunitaires
	Inhibiteurs de points de contrôles	Administration d'anticorps ciblant les interactions ligands/récepteurs des CI inhibiteurs. Le blocage de ces interactions va réactiver les lymphocytes effecteurs (voir Figure 25)	Ipilimumab, anti-CTLA-4 et Nivolumab, anti-PD-1 pour le traitement du mélanome métastatique

Tableau 4 : Classification et fonctionnement des principales immunothérapies.

Bae et al., 2019; Chow et al., 2019; Hodi et al., 2010; Kantoff et al., 2010; Kriegsmann et al., 2018; Pol et al., 2016; Rosenberg et al., 1985; Runcie et al., 2018; Wang et al., 2020

En 2011, l'anticorps anti-CTLA-4 ipilimumab est approuvé par la FDA et devient ainsi le premier inhibiteur de point de contrôle admis comme immunothérapie (Robert et al., 2011). L'anticorps anti-PD-1 pembrolizumab est ensuite approuvé en 2014 pour traiter les mélanomes à un stade avancé, suivi par les anticorps anti-PD-1 nivolumab et anti-PD-L1 atezolizumab ayant montré des bénéfices cliniques dans diverses tumeurs (Borghaei et al., 2015; Garon et al., 2015; Robert et al., 2015). L'action anergisante du couple PD-1/PD-L1 sur les lymphocytes T, explique que les anticorps ciblant PD-1 ou PD-L1 affectent principalement l'état effecteur de ces cellules (**Figure 25**). Toutefois, d'autres types cellulaires expriment le récepteur PD-1 et le ligand PD-L1, tels que les cellules dendritiques et les NKs, et pourraient donc être directement influencés par l'inhibition de cette voie, comme le montre des travaux réalisés sur des modèles murins ou cellulaires (Benson et al., 2010; Karyampudi et al., 2016). L'étude des effets de l'immunothérapie par anticorps dirigés contre PD-1/PD-L1 sur ces cellules mériterait d'être approfondie afin de mieux appréhender le mécanisme d'action de cette thérapie et de l'améliorer. En effet, bien que donnant lieu à des résultats prodigieux chez certains patients, l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 ne bénéficie qu'à une fraction restreinte des individus traités (Seidel et al., 2018).

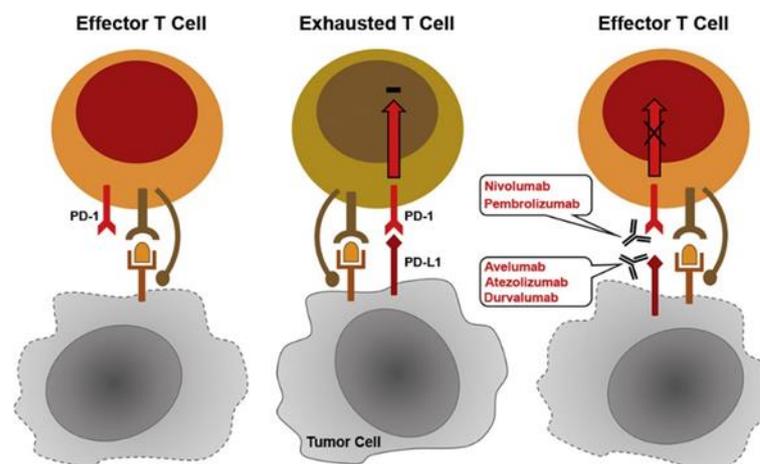


Figure 25 : Principe de l'immunothérapie par anti-PD-1/PD-L1.

Le TCR des lymphocytes T va venir reconnaître les antigènes présentés à la surface des cellules malignes ou des CPA par le CMH de classe I et acquérir des fonctions effectrices. L'engagement entre le ligand PD-1 exprimé à la surface des LT et son récepteur PD-L1 présenté par les cellules tumorales transmet des signaux qui favorisent l'épuisement des cellules T. Les anticorps ciblant PD-1 ou PD-L1 bloquent

cette interaction, permettant ainsi le maintien de la fonction effectrice des cellules T anti-tumorales. Adapté de *Hargadon et al., 2018*.

Les IFN- α constituent la première immunothérapie anti-tumorale approuvée par la FDA, et sont aujourd'hui utilisés dans le traitement de nombreux cancers solides ainsi que dans les cancers hématologiques. Bien que remplacée par de nouveaux traitements plus efficaces dans certains types de cancers, cette cytokine demeure utilisée dans des maladies telles que le mélanome métastatique (Fujimura et al., 2020).

La liste des immunothérapies approuvées par la FDA ne cesse de s'allonger, et tend de plus en plus vers des thérapies personnalisées grâce à l'essor des technologies de séquençage de nouvelle génération ainsi qu'à celui de l'ingénierie génétique *ex-vivo* (Brown et al., 2014; Sharma and Allison, 2015). D'autres mécanismes d'action sont développés tels que le ciblage du métabolisme ou du microbiome intestinal (McQuade et al., 2019; Orecchioni et al., 2015).

L'enthousiasme généré par l'immunothérapie provient en grande partie du fait que les réponses cliniques sont souvent efficaces et durables dans le temps. Toutefois, ces traitements ne bénéficient qu'à un faible pourcentage de patients, certains ne répondant pas à la thérapie ou subissant une rechute de la maladie, cette fois réfractaire à l'immunothérapie (Borcoman et al., 2018; Eisenhauer et al., 2009). Bien que bénéficiant d'une meilleure prise en charge du fait de la recrudescence de travaux, la toxicité de ces thérapies est aussi problématique, et conduit fréquemment à un arrêt prématuré du traitement (Kennedy and Salama, 2020). Les phénomènes de résistances acquises et primaires et de toxicité, ainsi que l'incroyable complexité de la dynamique tumorale nécessitent l'identification de nouvelles cibles d'immunothérapies, ainsi que des combinaisons de ces traitements.

3. Combinaison d'immunothérapies

Les combinaisons thérapeutiques sont préférées aux monothérapies car elles permettent l'emploi de doses moins importantes qui génèrent moins d'effets secondaires et bénéficient à une plus grande proportion de patients (Curran et al., 2010; Kohrt et al., 2014). En effet, les profils immunogènes des patients atteints de cancer sont modifiés différemment selon la thérapie effectuée, la combinaison de plusieurs traitements permettrait alors d'en améliorer l'efficacité. Ainsi, CTLA-4 et PD-1 semblent remplir des fonctions complémentaires dans la régulation de l'immunité adaptative, PD-1 contribue à l'épuisement des lymphocytes T dans les tissus périphériques tandis que CTLA-4 inhibe leur activation à un stade précoce. En clinique,

la combinaison d'anticorps dirigés contre PD-1 et CTLA-4 est efficace chez 53% des patients atteints d'un mélanome récidivant, contre 20% pour la monothérapie anti-CTLA-4 seule et 15% pour l'anti-PD-1 seul (Wolchok et al., 2013).

Les combinaisons peuvent avoir lieu entre différentes immunothérapies ou entre immunothérapie et thérapies conventionnelles telles que la radiothérapie ou la chimiothérapie. A l'image de la variabilité des cancers, la possibilité des combinaisons thérapeutiques est vaste et de nombreuses études sont en cours pour les définir, en expliquer les mécanismes, et en améliorer les effets.

Avec la possibilité de combiner les thérapies, les immunothérapies par IFN-I ont connu un nouvel essor ces dernières années. Que ce soit par administration directe ou induction indirecte de leur expression, de nombreuses études montrent que l'action des IFN-I a un effet bénéfique synergique avec d'autres immunothérapies ou thérapies standards (Burnette et al., 2011; Lucarini et al., 2017; Sistigu et al., 2014). De plus, il a été observé que des altérations de la voie des IFN-I sont associées à une réponse amoindrie ou une résistance aux thérapies ciblant les inhibiteurs de points de contrôle (Bald et al., 2014; Wang et al., 2017). En particulier, plusieurs études chez la Souris montrent l'action synergique de l'apport d'IFN-I couplé à des anticorps anti-PD-1/PDL-1. Cette action bénéfique des IFN-I est en outre dû à la reconstitution des fonctions anti-tumorales de ces cytokines auparavant abrogées par la tumeur. De plus, l'apport d'IFN-I entraîne la surexpression de PD-1 et PDL-1 qui, bien qu'ayant un effet initialement pro-tumoral, est associée à une meilleure réponse anti-tumorale dans un contexte de thérapie par anti-PD-1/PD-L-1 (Liang et al., 2018; Uehara et al., 2017; Wolchok et al., 2013). L'expression d'IFN-I peut aussi être induit indirectement par des agents induisant la voie IFN-I tels que poly(I:C) qui va venir mimer une infection virale. Ce procédé permet de limiter les effets secondaires importants induits par une administration systémique d'interférons (Sultan et al., 2020).

D. Rôle de SUMO dans l'immunité anti-tumorale

1. SUMO acteur de l'immunité innée

Comme évoqué précédemment, la réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes et micro-organismes extérieurs à l'organisme. Ces derniers expriment des motifs moléculaires hautement conservés nommés « *Pathogen*

Associated Molecular Patterns » (PAMP) ou motifs moléculaires associés aux pathogènes, qui sont reconnus par les PRR membranaires ou intracellulaires. L'engagement de ces récepteurs déclenche des voies de signalisation qui aboutissent à une réponse immunitaire. Nous nous intéresserons en particulier aux voies NF- κ B, IRF (« *interferon regulatory factors* »), ainsi qu'à la voie cGAS-STING (« *cyclic GMP-AMP synthase- stimulator of interferon genes* ») dont la régulation par la SUMOylation a été largement étudiée.

a) Voie NF- κ B

La SUMOylation intervient à plusieurs niveaux de la voie NF κ B et peut réguler cette voie positivement ou négativement. Comme expliqué précédemment, l'implication de SUMO est démontrée dès 1998 par l'équipe de Desterro qui décrit la modification d'I κ B- α par SUMO-1 sur la lysine 21, également utilisée par l'Ubiquitine. La protéine I κ B- α SUMOylée ne pouvant être ubiquitinée, elle devient donc résistante à la dégradation par le protéasome (Desterro et al., 1998). En revanche, la fonction de la SUMOylation de cette protéine par SUMO-2/3 reste sujette à débat, conduisant selon le contexte à une augmentation ou une diminution de la transcription des gènes cibles NF κ B. En effet, une étude plus récente révèle que la SUMOylation couplée à l'ubiquitination favorise la dégradation de l'I κ B- α par la formation de chaînes hybrides SUMO-Ubiquitine (Aillet et al., 2012). Il semblerait aussi que cette protéine puisse avoir une fonction de répresseur transcriptionnel nucléaire dépendant de la SUMOylation (Kracklauer and Schmidt, 2003).

SUMO peut également modifier la sous-unité p65 de NF κ B grâce à l'action de Pias3 comme le montre une étude réalisée sous stimulation par TNF- α dans des fibroblastes embryonnaires murins (Liu et al., 2012b).

En outre, la SUMOylation a aussi un rôle activateur dans le contrôle de cette voie. En effet, NEMO (« *Nuclear NF- κ B Essential Modifier* ») peut être SUMOylé par SUMO-2/3, menant à son ubiquitination et à son export dans le cytoplasme puis à l'activation du complexe IKK (« *I κ B kinase* ») (Mabb et al., 2006). Une boucle de rétrocontrôle négatif est également établie par Senp2 et Senp6 qui vont venir désSUMOyler NEMO (Lee et al., 2011; Liu et al., 2013).

La SUMOylation a donc un rôle majeur dans la régulation de la voie NF κ B qui peut être à la fois activateur et répresseur (**Figure 26**).

Ce contrôle de la voie NF κ B par SUMO est extrêmement important dans la réponse de l'organisme contre les agents pathogènes. Une régulation fine de cette voie est nécessaire pour

éviter les infections ou le développement de maladies auto-immunes. En outre, des activations aberrantes ou constitutives de NFκB ont été détectées dans de nombreux patients atteints de cancers (Cabannes et al., 1999; Migliazza et al., 1994).

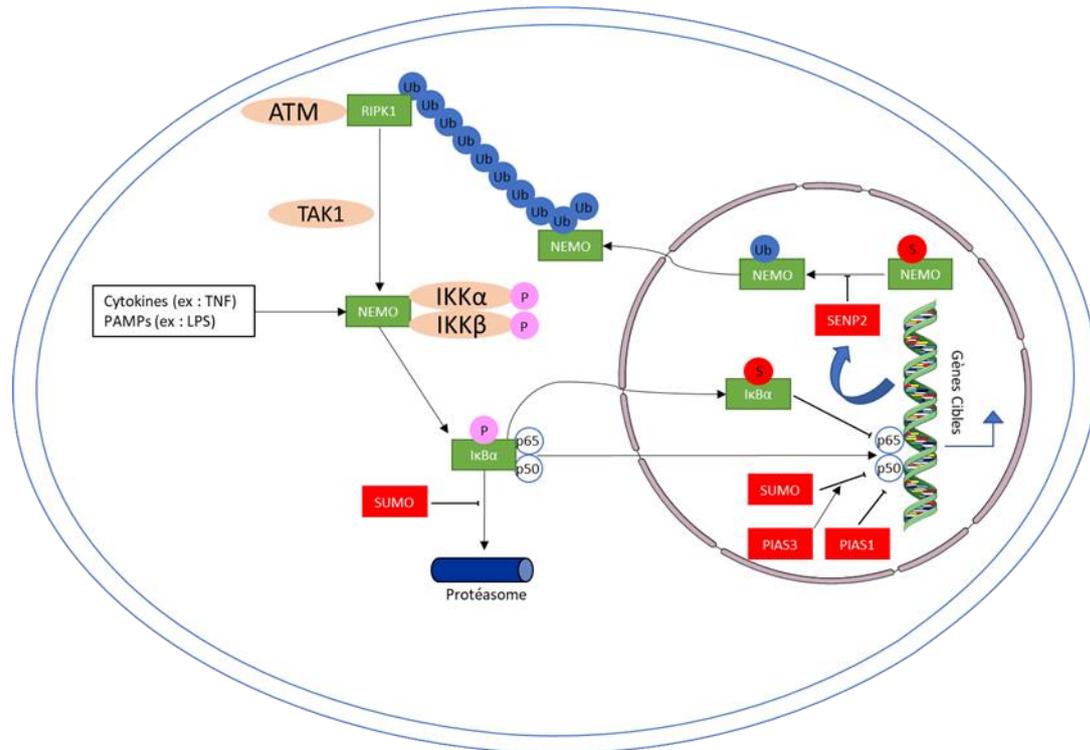


Figure 26 : Régulation de la voie NF-κB par la voie SUMO.

La liaison du ligand au TLR entraîne l'activation de la voie NFκB : les membres du complexe IKK sont phosphorylés et activés. Ce complexe phosphoryle IκB-α, induisant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cela libère NFκB formé par l'hétérodimère p65/p50, menant à sa translocation dans le noyau et à la transcription de gènes cibles dont font partie certaines cytokines pro-inflammatoires. La SUMOylation agit au niveau d'IκB-α en entrant en compétition avec l'ubiquitination, ce qui empêche sa dégradation et entraîne la rétention de NFκB dans le cytoplasme. De plus, la SUMOylation d'IκB-α et de p65 semble corrélée à une inhibition de l'activité de cette voie. La voie SUMO agit aussi au niveau de la chromatine avec l'inhibition de la liaison à l'ADN de l'hétérodimère p65/p50 par Pias1. La SUMOylation peut en outre avoir un rôle activateur de cette voie via la modification de NEMO qui va entraîner son ubiquitination et sa translocation dans le cytoplasme, où il formera un complexe qui va phosphoryler IKKα et IKKβ, activant ainsi le complexe IKK. Senp2 va agir de manière inverse, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif. Adapté de *Seeler and Dejean, 2017*.

b) Voie IRF

La production d'interférons de type I et II est un mécanisme crucial dans la réponse immunitaire innée. Les voies qui les produisent sont rigoureusement régulées à plusieurs niveaux par la SUMOylation et font majoritairement intervenir les facteurs de transcription IRF, capables de se lier à des séquences ISRE. On retrouve ces séquences au niveau des promoteurs des ISGs ainsi que dans les promoteurs des IFN de type I eux-mêmes. La voie de signalisation des IRFs ainsi que l'action de SUMO sur les composants de cette voie sont résumés **Figure 27**.

Des tests de transfection transitoires ont révélés que Mda5 (« *melanoma differentiation-associated protein 5* ») et Rig-I (« *retinoic acid-inducible gene 1* ») pouvaient être SUMOylés ce qui corrélait avec une augmentation de l'induction d'IFN-I (Fu et al., 2011; Mi et al., 2010). La reconnaissance par les PRR d'acide polyinosinique-polycytidylique (polyI:C), mimétique d'une infection virale entraîne une SUMOylation de Mda5 corrélée à une hausse de l'expression de l'IFN- β tandis que la délétion de l'E3 ligase Pias2 diminue à la fois la SUMOylation de MDA5 et la production d'IFN- β . La SUMOylation de RIG-I améliore quant à elle son ubiquitination, ce qui permet une interaction accrue avec la molécule Cardif.

Chez l'Homme, les résidus lysine 70 et 87 de l'Irf3 sont SUMOylés, ce qui, par effet de compétition avec la polyubiquitination, protège ce facteur de la dégradation par le protéasome et mène à une régulation positive de la voie (Ran et al., 2011). D'autres études chez la Souris ont en revanche rapporté qu'à la suite d'une infection par le virus VSV (« *Vesicular Stomatitis Virus* »), Irf3 et Irf7 étaient SUMOylés ce qui régulerait négativement la voie IFN. En effet, après infection virale, les mutants Irf3 et Irf7 SUMO-déficients induisent une plus forte expression d'IFN que les contrôles ce qui suggère un rôle répresseur de SUMO sur leur activité transcriptionnelle (Kubota et al., 2008). Il semble donc que les cellules humaines et murines utilisent un mécanisme commun pour réguler la stabilité de l'Irf3, mais régulent différemment son activité.

SUMO agit aussi sur la voie de signalisation en aval de l'IFN-II *via* son action sur Stat1, un des facteurs clés de cette voie qui, contrairement à la voie IFN-I, agit en homodimère et non en hétérodimère (voir **Figure 23**). De fait, plusieurs études démontrent la SUMOylation de Stat1 par les PIAS (Ungureanu et al., 2003, 2005). Cette SUMOylation est associée à une répression de la phosphorylation de cette protéine et donc de sa liaison à l'ADN sous sa forme homodimère (Grönholm et al., 2012). L'IFN- γ lui-même exerce un rétrocontrôle négatif sur sa propre voie de signalisation en favorisant la SUMOylation de Stat1.

Toutefois, bien que SUMO inhibe la phosphorylation de Stat1 en réponse à l'IFN- α , il n'altère pas celle de Stat2. Des complexes alternatifs d'homodimères Stat2 se forment afin de compenser l'effet de SUMO-Stat1 (Maarifi et al., 2015).

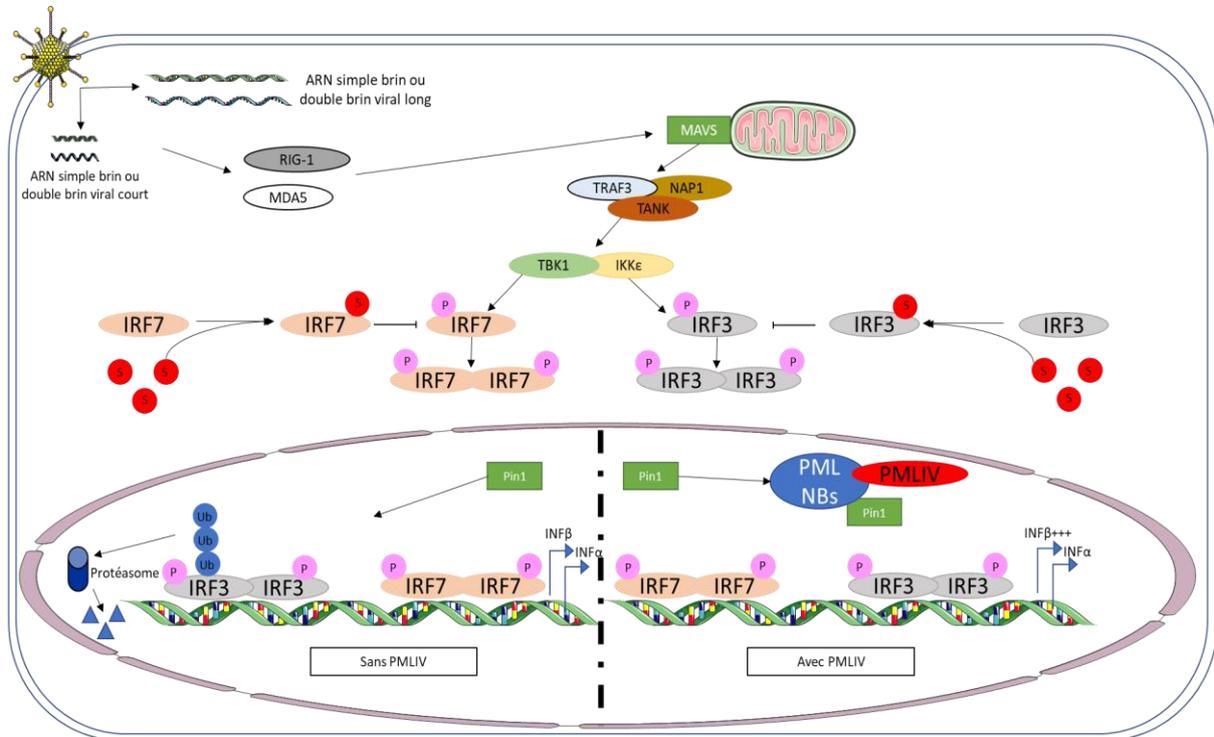


Figure 27: Rôle de la SUMOylation dans la voie interféron.

La réponse IFN de type I est initiée par la détection de l'ARN ou de l'ADN viral par les PRR. Les hélicases Rig-I et Mda5 vont détecter l'ARN viral et recruter la protéine adaptatrice MAVS (« *Mitochondrial Antiviral Signaling* »). MAVS va à son tour activer les kinases Tbk1 (« *TANK-Binding Kinase 1* ») ou IKKε qui phosphorylent ensuite Irf3 et Irf7. Sous leur forme phosphorylée, Irf3 et Irf7 s'homodimérisent et transloquent vers le noyau afin d'induire l'expression des gènes IFN de type I. Rig-I et Mda5 peuvent être SUMOylés ce qui a pour effet d'augmenter la production d'IFN de type I. De plus, la SUMOylation d'Irf3, par compétition avec l'ubiquitination, favoriserait sa stabilisation et la production d'IFN-I. Toutefois, la modification par SUMO d'Irf3 et Irf7 aurait aussi une fonction inhibitrice sur la voie. Enfin, Pin1 interagit avec l'Irf3 sous sa forme phosphorylée et induit sa dégradation par le biais de l'ubiquitination. Or, l'isoforme v SUMOylée peut retenir Pin1 au niveau des corps PML et ainsi empêcher la dégradation de l'Irf3 phosphorylé, permettant la synthèse d'IFN-β.

c) Voie cGAS-STING

Une autre voie contrôlée par SUMO et située en amont des voies NFκB et IFN est la voie cGAS-STING. Après reconnaissance d'un ADN viral ou cytosolique, cGAS catalyse la synthèse de cGAMP (« *Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate* »), un second messager qui va venir se lier à la protéine adaptatrice STING et déclencher différentes voies de signalisation menant à la transcription d'ISGs et de gènes de réponse à l'inflammation (Hopfner and Hornung, 2020).

Après stimulation par de l'ARN viral, du LPS, du TNF-α ou de l'IL-1β, il a été montré que les deux effecteurs principaux de cette voie, cGAS et STING, sont SUMOylés rapidement par l'E3 ligase TRIM38 (« *Tripartite Motif Containing 38* »), ce qui les stabilise et régule positivement la voie (Hu et al., 2015). La désSUMOylation de ces facteurs lors des stades tardifs de la stimulation conduit à leur dégradation et à une diminution de la réponse immunitaire, résolvant ainsi l'inflammation (Hu et al., 2015). Toutefois, comme pour les voies NFκB et IRF, la SUMOylation joue également un rôle inhibiteur.

En effet, la SUMOylation réprime le potentiel de détection de l'ADN par cGAS, ce qui va réguler négativement la voie de signalisation. Cette inhibition est levée par l'activité de Senp7 (Cui et al., 2017). Senp2 et Senp7 ont donc des fonctions et des cibles différentes, ce qui peut s'expliquer par la spécificité de Senp7 pour les chaînes poly-SUMO, alors que Senp2 peut cliver à la fois les mono et poly-SUMO suggérant un effet différentiel de la mono- et poly-SUMOylation sur la voie cGAS-STING.

d) Voies des MAPK

Les voies de signalisation MAPK sont composées d'une succession de protéines à activité kinase regroupées en trois cascades, soit les voies JNK (« *Jun N-terminal Kinase* »), p38 et ERK (« *Extracellular signal-Regulated Kinase* ») pouvant toutes être activées par les TLR (voir **Figure 23**). Par une série de phosphorylation en chaîne, elles vont venir activer des facteurs de transcription impliqués notamment dans l'inflammation.

En aval de la voie MAPK, les kinases MEK1 et MEK2 (« *MAP/ERK kinase-1/2* ») sont directement modifiées par SUMO ce qui conduit à l'inhibition de leur activité kinase (Kubota et al., 2011). De même, toujours en aval de la voie MAPK, l'activité du FT Elk-1 (« *ETS Transcription Factor ELK1* ») est inhibée par la SUMOylation (Yang et al., 2003).

De même, SUMO régule négativement d'autres FT activés par les voies MAPK tels que les membres du complexe AP1 (« *activating protein-1* »), un hétérodimère formé par l'association de deux FT dont JUN (c-JUN, JUNB et JUND), FOS (« *FBJ Osteosarcoma oncogene* » : c-FOS, FOSB, FRA-1 et FRA-2), les ATF (« *activating transcription factor* » : ATF2-7 et B-ATF) et la famille des MAF (« *musculoaponeurotic fibrosarcoma* » : c-MAF, MAFA, MAFB, MAFF, MAFG, MAFK). Le complexe AP-1 a notamment un rôle important dans la réponse immunitaire à divers stimuli (Foletta et al., 1998). Ainsi, la forme SUMOylée de MafG sous forme homodimère réprime activement la transcription *via* le recrutement d'histones déacétylases tandis que sa forme d'hétérodimère non-SUMOylée est activatrice. SUMO inhibe également l'activité transcriptionnelle d'autres membres du complexe AP1 tels que FOS et ATF3 (Tempé et al., 2014; Wang et al., 2013a)

2. Sumo au cœur de l'immunité croisée

En plus de l'implication de la SUMOylation dans le contrôle de voies majeures de l'immunité innée, des travaux réalisés dans le laboratoire ont démontré un rôle direct de SUMO sur la régulation du gène *Ifnb1* codant pour l'IFN- β .

En effet, la perte de la SUMOylation *via* une délétion d'*Ubc9* est suffisante pour initier une réponse IFN-I spontanée dans des cellules myéloïdes. De plus, la stimulation de ces cellules SUMO-déficientes par divers stimuli entraîne une réponse IFN- β massive et durable comparée aux cellules contrôles (**Figure 28**).

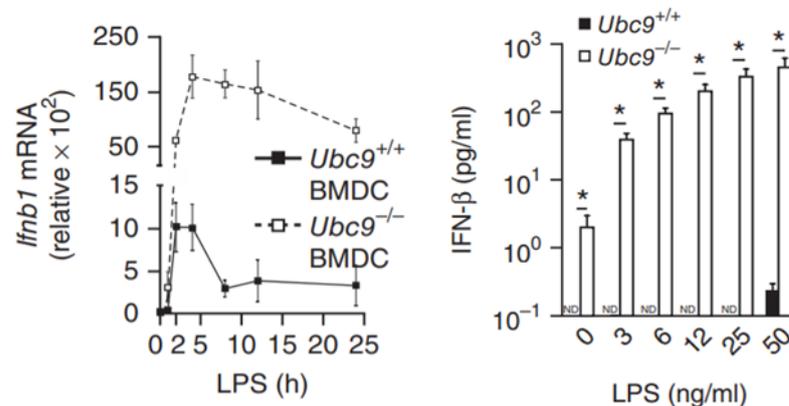


Figure 28 : Un déficit de la SUMOylation induit une réponse massive et constitutive d'IFN- β .

La stimulation des BMDCs (« *Bone Marrow derived Dendritic Cells* ») par différents temps et concentrations de LPS induit une expression massive et durable d'IFN- β à la fois au niveau transcriptionnel (panel de gauche) et protéique (panel de droite). De Decque et al., 2016

Cette production massive d'IFN- β entraîne une réponse immunitaire innée accrue totalement dépendante de la déplétion de SUMO sur le gène *Ifnb1* comme le prouve l'abrogation de l'expression des ISGs et des cytokines pro-inflammatoires suivant la délétion du récepteur *Ifnar* dans des cellules SUMO-déficientes (Decque et al., 2016).

Mécanistiquement, SUMO agirait depuis trois « *enhancer* » distaux du gène *Ifnb1* afin d'inhiber l'activité à la fois basale et induite de son promoteur, comme le montre la présence de SUMO-1 et 2 sur ces sites et la disparition de SUMO-1 sous stimulation (**Figure 29**).

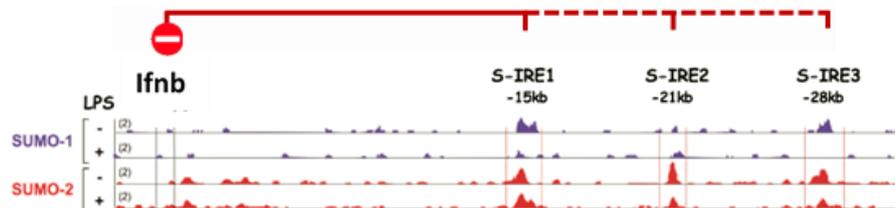


Figure 29 : Action inhibitrice distale de la SUMOylation sur l'activité du promoteur *Ifnb1*.

Analyse par ChIP-Seq de l'occupation de SUMO-2 et SUMO-1 au locus *Ifnb1* dans des BMDCs non-stimulées ou stimulées pendant 2h avec du LPS. Adapté de *Decque et al., 2016*.

Ces travaux ont également montré que la perte de SUMOylation rend les souris à la fois plus susceptibles au choc septique comme elle les protège contre les infections virales.

Ainsi, la SUMOylation agit comme un répresseur majeur de la réponse immunitaire innée de par sa régulation directe du gène *Ifnb1* et de son action sur les voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire. Il est important de noter qu'étant donné l'importance des IFN-I pour l'activation de l'immunité adaptative, SUMO a aussi un rôle conséquent dans la communication cellulaire entre les effecteurs des immunités innée et adaptative, ce qui en fait une cible idéale pour les traitements anti-tumoraux, en particulier en combinaison avec de l'immunothérapie.

3. SUMO comme cible directe dans le traitement contre le cancer

Etant donné les rôles de SUMO dans le cancer et l'immunité innée, il serait intéressant d'en tirer parti et d'agir sur le SI par le biais de la SUMOylation lors de thérapies anti-tumorales. De fait, une étude encore non-publiée de Takeda semble montrer que l'inhibiteur de SUMO TAK-981 a une activité anti-tumorale dans un modèle de lymphome murin dépendante du récepteur Ifnar (Berger et al., 2019). Une autre étude en cours par Takeda, suggère que TAK-981 favorise la réponse immunitaire anti-tumorale grâce à une présentation d'antigènes améliorée conduisant à une activation des cellules T cytotoxiques chez la Souris (Khattar et al., 2019). Cette étude souligne bien le rôle central de SUMO dans les immunités innée et adaptative.

Plusieurs essais cliniques employant TAK-981 sont en cours. Bien que les résultats n'aient pas encore été communiqués, il est intéressant de noter que les résultats obtenus sur des modèles précliniques sont suffisamment satisfaisants pour engendrer des essais sur l'Homme. Un de ces essais est en phase I/II chez des patients atteints de tumeurs solides ou de lymphomes métastatiques (ClinicalTrials.gov : NCT03648372).

Plus intéressants encore, plusieurs essais cliniques en cours associent TAK-981 avec des anticorps dirigés contre des inhibiteurs de points de contrôle, ce qui est en accord avec le rôle synergique de l'IFN-I et des immunothérapies par anti-PD-1/PDL-1.

Un de ces essais de phase I associe TAK-981 et une thérapie anti-PDL1 ou anti-EGFR chez des patients atteints d'un cancer de la sphère ORL (ClinicalTrials.gov : NCT04065555). Deux essais en phase Ib/II associe respectivement le TAK-981 avec un anti-CD20 chez des patients atteints de lymphome non hodgkinien (ClinicalTrials.gov : NCT04074330) et avec un anti-CD38 chez des adultes atteints de myélomes réfractaires (ClinicalTrials.gov : NCT04776018). Un dernier essai plus récent teste la combinaison de TAK-981 avec un anti-PD-1 chez des patients atteints de cancers métastatiques ou à un stade avancé (ClinicalTrials.gov : NCT04381650).

TAK-981 est donc à l'heure actuelle un candidat prometteur dans l'utilisation de l'inhibition de la SUMOylation dans un but thérapeutique.

IV. SUMO et régénérescence musculaire

A. SUMO et identité cellulaire

1. Impact de SUMO sur l'identité des cellules souches

Les premières évidences d'un rôle de la SUMOylation dans l'identité des cellules souches proviennent d'expériences de délétions de membres de la voie SUMO dans des modèles murins et cellulaires ayant abouties à une létalité embryonnaire. Ainsi, la délétion d'Ubc9 chez la Souris provoque une létalité embryonnaire très précoce, à un stade antérieur à E7.5 tandis que les souris déficientes en Sumo-2, Senp2 et Pias1 présentent une létalité embryonnaire aux alentours de E10, de même que celles déficientes en Senp1 qui décèdent au stade E12.5 (Constanzo et al., 2016; Kang et al., 2010; Sharma et al., 2013; Wang et al., 2014). SUMO ayant un rôle dans la mitose, comme évoqué précédemment, il semble normal qu'il ait une fonction importante dans les premières étapes du développement embryonnaire. Toutefois, la létalité précoce observée dans ces études ne met pas nécessairement en avant un problème de division cellulaire et semble impliquer un rôle distinct de la voie SUMO.

Une autre preuve de l'impact de la SUMOylation sur l'identité des cellules souches provient de différentes études portant sur la modification par SUMO des facteurs de pluripotence Oct4 (« *octamer-binding transcription factor 4* »), Sox2 (« *SRY-Box Transcription Factor 2* ») et Klf4 (« *Kruppel-like factor 4* »), et sur la surexpression de *Nanog* suite à la suppression de SUMO-1 et d'Ubc9 dans des cellules de carcinomes embryonnaires (Du et al., 2010; Tsuruzoe et al., 2006; Wei et al., 2007; Wu et al., 2012). Bien que l'impact de la voie SUMO semblent varier d'un facteur à l'autre, elle apparaît globalement comme activateur et sa délétion entraîne une diminution de leur expression ce qui impliquerait un rôle de maintien de l'identité souche de la cellule (Tahmasebi et al., 2014). Des travaux réalisés dans le laboratoire sont en accord avec ces observations et permettent de confirmer la fonction de SUMO dans le maintien de la pluripotence *via* son action à la chromatine. En effet, l'identification des substrats endogènes de SUMO dans des MEFs (« *Mouse Embryonic Fibroblasts* ») et des ESCs (« *Embryonic Stem Cells* ») par le biais d'un SUMOylome a permis d'établir un rôle de la SUMOylation dans le maintien de l'hétérochromatine des ESCs. Cette étude démontre que dans les ESCs, SUMO-2/3 agit principalement sur des complexes répressifs

de la chromatine ainsi que des protéines impliquées dans le dépôt et la liaison de la marque d'hétérochromatine H3K9me3, empêchant de ce fait l'ouverture de la chromatine et la transition vers des états totipotents (Cossec et al., 2018).

Si SUMO est essentiel pour le maintien de l'identité cellulaire des cellules souches embryonnaires, il semble aussi avoir un rôle sur les cellules souches adultes. Nous citerons notamment un exemple réalisé au sein du laboratoire et montrant que la perte d'*Ubc9* chez la souris adulte entraîne une mort rapide causée par la dégénérescence de l'épithélium intestinal. La perte de la SUMOylation affecte principalement le compartiment de la crypte en provoquant la disparition des cellules souches Lgr5⁺ CBC (« *crypt base columnar cell* ») compromettant ainsi la formation, la fonction et la survie de toutes les cellules épithéliales différenciées (Demarque et al., 2011). En revanche, la perte d'un allèle *Ubc9* chez la Souris est associée à un nombre accru de cellules souches Lgr5⁺ CBC ainsi qu'à une augmentation des programmes d'expression génétique de type souche et d'inflammation, appuyant encore le rôle de la voie SUMO dans le maintien de l'état souche des cellules multipotentes adultes (López et al., 2020). Ces exemples nous montrent également l'effet dose-dépendant de SUMO dont nous discuterons postérieurement.

2. SUMO et conversions cellulaires induites

Le rôle de la SUMOylation a également été étudié dans des modèles de changements d'identité cellulaires induits par différents facteurs de transcription. Il a ainsi été démontré qu'une hypoSUMOylation *via* une baisse d'*Ubc9* favorise la reprogrammation de fibroblastes en cellules pluripotentes et que l'inhibition de SUMO-2/3 permet une meilleure reprogrammation de cellules différenciées vers les iPSCs (« induced Pluripotent Stem Cells ») ces deux modèles ayant été confirmés par des travaux réalisés au sein du laboratoire (Borkent et al., 2016; Cheloufi et al., 2015; Cossec et al., 2018).

Bien qu'encore peu étudiés, plusieurs études employant des modèles de transdifférenciation semblent établir un rôle inhibiteur de la SUMOylation dans ce processus.

Pour exemple de transdifférenciation induite, la SUMOylation du facteur sanguin Cebpβ (« *CCAAT/enhancer-binding protein beta-2* »), connu pour entraîner la transdifférenciation de cellules B en macrophages, DCs et granulocytes, semble inhiber le changement d'état des macrophages vers les granulocytes (Stoilova et al., 2013).

Enfin, des travaux réalisés au laboratoire sur deux modèles de transdifférenciation ont montré un rôle inhibiteur de la SUMOylation dans cette activité. Le premier modèle vise à convertir des MEFs en neurones *via* la surexpression des facteurs Brn2a (« *brain-2* »), Ascl1 (« *Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1* ») et Myt1l (« *myelin transcription factor 1 like* ») et montre que la délétion d'*Ubc9* double le nombre de cellules transduites. De même, l'altération de la voie SUMO favorise la transdifférenciation de cellules pré-B en macrophages (Cossec et al., 2018).

Un rôle direct de la modification par SUMO sur la différenciation cellulaire a également été mis en avant dans cette étude. Les modèles utilisés sont ceux de la différenciation induite de promyélocytes leucémiques humains HL-60 en granulocytes par l'action de l'acide rétinoïque (AR), et de myéloblastes immatures en neutrophiles. Dans les deux cas, une hypoSUMOylation favorise la différenciation des cellules (Cossec et al., 2018).

Comme nous venons de la voir, une hypoSUMOylation favorise donc la reprogrammation vers la pluripotence, la conversion de cellules pluripotentes en cellules totipotentes, la transdifférenciation ainsi que la différenciation induite (**Figure 30**). SUMO agit donc comme une barrière générale aux transitions cellulaires *via* son action à la chromatine qui permet la préservation des états somatiques et pluripotents.

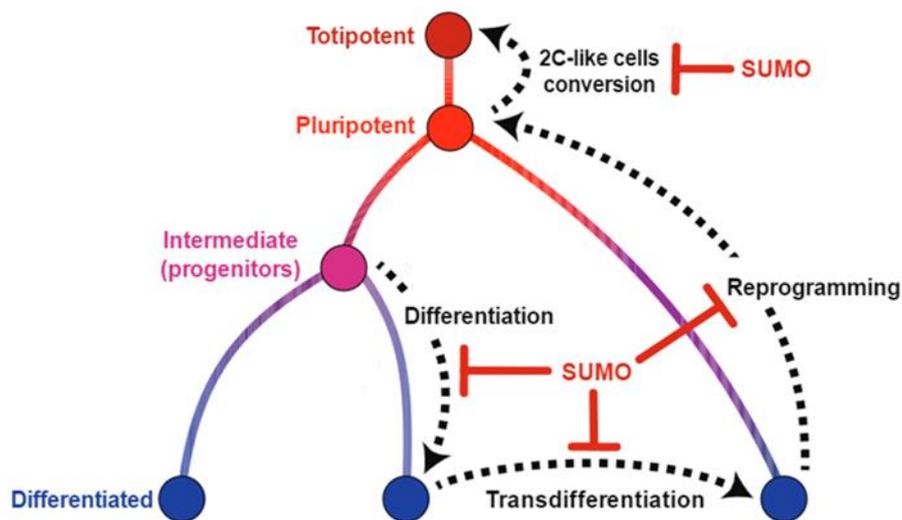


Figure 30 : SUMO est un gardien majeur de l'identité cellulaire.

Des expériences de conversions cellulaires induites ont montrées un rôle de SUMO dans le maintien de l'identité cellulaire à la fois au niveau du passage de la pluripotence à la totipotence, de la reprogrammation de cellules différenciées en cellules pluripotences, de la différenciation et de la transdifférenciation. De Cossec et al., 2018.

Etant donné le rôle majeur de SUMO dans le maintien de l'identité cellulaire, nous avons décidé de mieux connaître son rôle dans un organe dont la plasticité cellulaire, la croissance prodigieuse ainsi que les grandes capacités régénératrices impliquent de nombreux changements d'identité cellulaires : le muscle squelettique.

B. Le modèle de régénération du muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont les muscles qui se contractent sous l'action d'un mouvement volontaire, au contraire des muscles lisses et du muscle cardiaque. Ils représentent 30 à 40% de notre masse corporelle et permettent au corps de se mouvoir. Cet organe présente des capacités extraordinaires de plasticité et d'adaptation, capable d'hypertrophie chez des athlètes ou d'atrophie dans des maladies telles que le cancer (on parle alors de cachexie dans ce cas particulier). Parmi ces remarquables propriétés, une des plus notables est le potentiel de régénération. En effet, lors d'une lésion musculaire, un ensemble finement coordonné de réponses cellulaires et moléculaires est activé. Il commence par une réponse inflammatoire, passe par un cycle nécrotique et finit par un processus de régénération qui conduit à la reconstitution de fibres musculaires innervées, vascularisées et complètement fonctionnelles. À l'origine de cette capacité de régénération musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, appelées cellules satellites du fait de leur localisation en périphérie des fibres musculaires (**Figure 31**). De fait, l'ablation du pool total de cellules satellites à l'âge adulte abolit complètement la régénération musculaire (Lepper et al., 2011).

Les cellules satellites ont été décrites pour la première fois en 1961 par Alexander Mauro (Mauro, 1961). Ces cellules sont capables de sortir de leur état de quiescence lors d'une blessure musculaire, de migrer vers le site endommagé où elles prolifèrent rapidement et de se différencier en myoblastes puis en myocytes qui vont fusionner et former ainsi des cellules multinucléées appelées myotubes (Sambasivan et al., 2011). De plus, les cellules satellites se divisent de manière asymétrique, une partie de ces cellules va donc retourner à l'état initial de quiescence et rétablir la réserve de cellules souches du muscle. Ces cellules souches tissulaires sont caractérisées sous leur forme quiescente par l'expression du facteur de transcription Pax7 (« *paired-box 7* ») et restent ancrées à la membrane plasmique des myofibres, appelée sarcolemme. Elles sont recouvertes par la matrice extracellulaire (MEC) de la lame basale qui

s'avère nécessaire à l'activation de la myogenèse et aux étapes de régénération qui s'ensuivent (**Figure 31**).

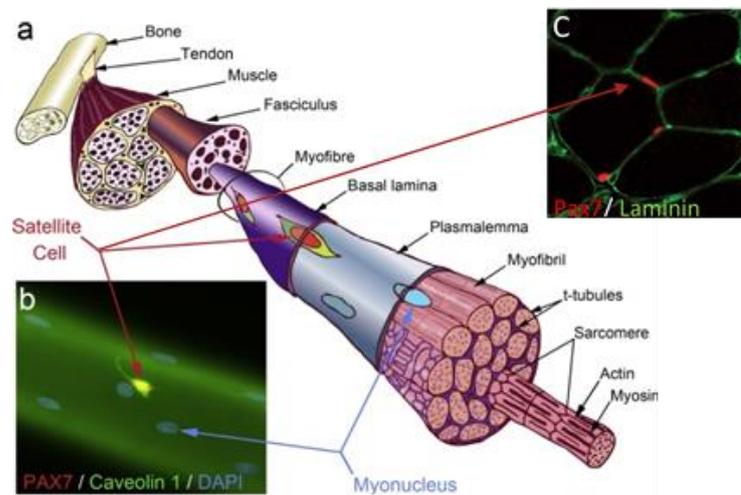


Figure 31 : Structure du muscle squelettique et localisation des cellules satellites.

(a) Structure d'un muscle squelettique. La niche de cellules satellites se trouve entre le plasmalemma de la myofibre et la lame basale environnante. (b) Cellule satellite marquée pour la Cavéoline 1 (vert) et Pax7 (rouge). Le DAPI marque les noyaux de la myofibre. (c). Cellule satellite marquée par Pax7 (rouge). La Laminie marque la lame basale. Adapté de *Ciciliot and Schiaffino, 2010; Zammit, 2017*.

La régénération musculaire est un processus régi par l'activité de facteurs de transcription spécifiques et essentiels à la régulation des événements myogéniques. Lors d'une blessure musculaire, les cellules satellites sont activées et prolifèrent, elles coexpriment alors Pax7 ainsi que MyoD (« *Myoblast determination protein* ») et Myf5 (« *Myogenic Factor 5* »)—deux marqueurs précoces de l'engagement myogénique, et se différencient en myoblastes. Sous l'action de Sprouty1, une partie des cellules satellites activées régule négativement MyoD et résiste au processus de différenciation, retournant ainsi à l'état de quiescence et maintenant la réserve de cellules souches (Shea et al., 2010). Pax7 et Myf5 cesse ensuite de s'exprimer tandis que l'expression de la myogénine augmente, permettant la différenciation des myoblastes en myocytes. L'expression de la myogénine et de Mrf4 (« *myogenic regulatory factor 4* ») sont alors régulées à la hausse, les cellules entament leur programme de différenciation terminale, sortent de manière permanente du cycle cellulaire et fusionnent afin de former les myotubes (**Figure 32**). L'expression de protéines contractiles telles que MyHC (« *Myosin heavy chain* ») apparaît également à cette étape (Bentzinger et al., 2012). Myf5, MyoD, myogénine et Mrf4

sont essentiels à la myogenèse et sont donc appelés MRFs (« *myogenic regulatory factors* »). Lors de la régénération musculaire, le ratio entre ces différents facteurs est important pour la définition du destin cellulaire. L'expression des homéoprotéines Six1/4 est quant à elle nécessaire lors de la myogenèse *via* le contrôle de MyoD et myogénine (Chakroun et al., 2015; Grifone et al., 2005; Le Grand et al., 2012).

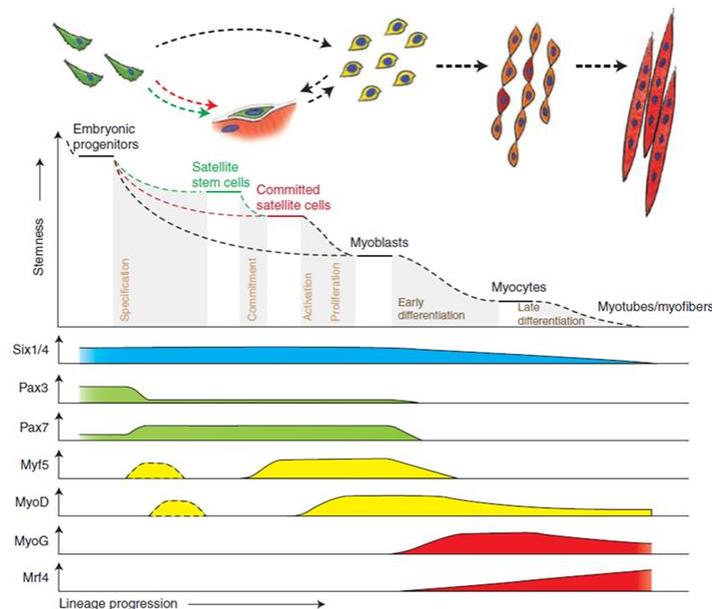


Figure 32 : Profil d'expression des principaux régulateurs myogéniques au cours de la régénération du muscle squelettique. Adapté de *Bentzinger et al., 2012*.

D'autres cellules jouent un rôle important dans la régénération musculaire telles que les cellules de la MEC, comme évoqué précédemment, les fibroblastes et les cellules immunitaires. Parmi ces dernières, les macrophages et les neutrophiles sont des acteurs clés lors de la régénération musculaire. Les neutrophiles apparaissent peu de temps après la lésion du muscle et aident à déclencher la réponse inflammatoire. Ils contribuent à la phagocytose des fibres endommagées et au recrutement des macrophages sur le site de la lésion. Les macrophages M1 prennent ensuite le relai en produisant des cytokines pro-inflammatoires et participent en phagocytant les fibres endommagées. Les M2 viennent ensuite résorber la réponse inflammatoire en relarguant des cytokines anti-inflammatoires (Tidball, 2017). Une population lymphoïde est également présente au site lésionnel avec les lymphocytes T CD8 qui aident au recrutement des macrophages, et les Treg qui régulent l'inflammation (Zhang et al., 2014). Cette réponse inflammatoire est couplée aux stades initiaux de la myogenèse, lorsque les cellules satellites sont activées et commencent à proliférer et à se différencier. Les acteurs de cette étape inflammatoire arrivent dans un ordre précis et finement régulé (**Figure 33**).

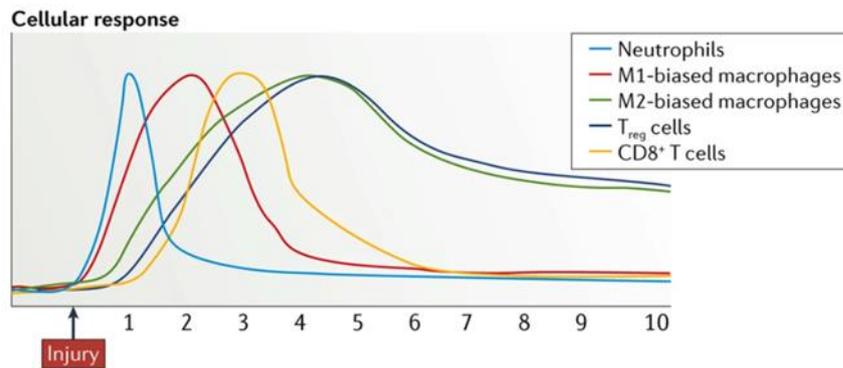


Figure 33 : Dynamique des cellules inflammatoires lors de la régénération musculaire.

Adapté de Tidball, 2017.

Les cellules inflammatoires influencent également la régénération musculaire par le biais d'interactions avec d'autres effecteurs de la myogenèse. Nous prendrons pour exemple les interactions entre les cellules immunitaires et les cellules progénitrices fibro-adipogéniques (FAPs : « *Fibro/Adipogenic Progenitors* »). De même que les cellules satellites, les FAPs s'activent rapidement après une blessure et se mettent alors à proliférer. Ils atteignent leur nombre maximum trois jours après la blessure pour redescendre à des niveaux normaux à environ 7 jours. De nombreuses études *in vivo* et *ex vivo* suggèrent un rôle de soutien des FAPs dans la différenciation des cellules souches satellites *via* la sécrétion de facteurs paracrine (Joe et al., 2010). Il semblerait que ces cellules soient régulées par les cellules myéloïdes présentes au site du dommage. En effet, lorsque les FAPs atteignent leur nombre maximal, ils deviennent la cible du TNF- α sécrété par les macrophages M1 et entrent en apoptose. Lorsque les macrophages passent d'un phénotype M1 à M2, ils produisent alors du TGF- β qui induit la sécrétion de matrice extracellulaire par les FAPs. Ces dernières jouent donc un rôle essentiel dans le maintien d'un environnement favorable à la régénération, et nécessitent une régulation fine, au risque de provoquer une augmentation du dépôt de MEC par les FAPs et une fibrose pathologique (Lemos et al., 2015).

Un autre type d'effecteurs cellulaires essentiel au bon déroulement de la régénérescence sont les cellules endothéliales vasculaires. Ces cellules reconstruisent le système vasculaire nécessaire à la maturation des fibres, et des vaisseaux commencent à apparaître dès la fin du processus nécrotique (Majka et al., 2003). Elles auraient également un rôle dans la régénération des fibres *via* la sécrétion paracrine sur les cellules satellites de facteurs tels que l'angiopoïétine-

1 (Ang-1) et le VEGF qui favorise leur prolifération et différenciation (Bryan et al., 2008; Mofarrahi et al., 2015).

La **figure 34** présente un aperçu des trois grandes étapes de la régénération musculaire : la réponse inflammatoire ; l'activation, la différenciation et la fusion des cellules satellites ; et la maturation des myofibres nouvellement formées.

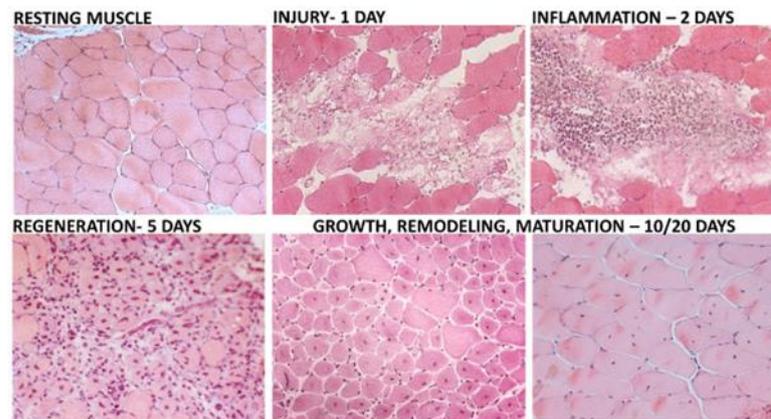


Figure 34 : Images représentatives du processus de régénération musculaire après induction d'une blessure.

Un jour après injection de cardiotoxine, les fibres apparaissent nécrosées, et un infiltrat inflammatoire est visible dès le second jour. Des fibres nouvellement régénérées se forment dans les jours qui suivent. Une dizaine de jours après induction de la blessure, l'architecture du muscle est restaurée, les fibres sont petites et centronuclées. Par la suite, les myofibres deviennent matures, leur diamètre augmente et les noyaux se relocalisent progressivement en périphérie. Coupes histologiques réalisées par marque avec l'Hématoxyline et l'Eosine (H&E). Adapté de *Forcina et al., 2020*.

La régénération des fibres musculaires conduit en général à un tissu totalement restauré et fonctionnel. Toutefois, certaines pathologies dont les dystrophies musculaires altèrent ce processus et compromettent la guérison du muscle. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une pathologie bien étudiée d'atrophie et de défaut de régénération musculaire. La DMD est une maladie dégénérative causée par l'absence ou la réduction drastique de la protéine dystrophine, impliquée dans le soutien de la fibre musculaire en créant un lien entre le cytosquelette et la MEC. Le gène codant pour la dystrophine, appelé *Dmd*, est un des plus grands gènes humains connus avec 79 exons et 7 promoteurs, donnant lieu à plusieurs isoformes de protéines tissus-spécifiques. Il est également la cible de nombreux épissages alternatifs. Chez les individus déficients en dystrophine, les myofibres s'abîment à chaque contraction et la niche de cellules satellites est insuffisante pour régénérer le tissu musculaire lésé, ce qui mène à une

dégénération chronique et progressive des fibres musculaires. En outre, l'absence de dystrophine a un effet délétère sur les cellules satellites, induisant la fibrose et l'apparition de graisse musculaire, signes d'une mauvaise régénération. En effet, des études ont montré que dans des modèles de dystrophies, les cellules satellites, en plus de leur intense sollicitation, présentent un défaut de division cellulaire asymétrique mais aussi de différenciation, un engagement myogénique réduits ainsi qu'une susceptibilité accrue à entrer en sénescence (Dumont et al., 2015; Sousa-Victor et al., 2014). De plus, la Dystrophine étant exprimée dans de nombreux organes, les patients atteints de DMD souffrent aussi d'insuffisance respiratoire, de cardiomyopathies et parfois de troubles cognitifs. L'espérance de vie des individus touchés par cette pathologie se voit ainsi réduite de 75 % (McGreevy et al., 2015). De nombreux traitements sont employés pour traiter les effets secondaires de cette maladie, mais aucun traitement curatif n'existe à ce jour, rendant nécessaire l'utilisation de modèles pour étudier cette pathologie (Mackenzie et al., 2021).

La plupart des modèles murins de DMD présentent des mutations de la dystrophine. La première lignée de souris modèles de cette pathologie correspondait aux Dmd^{mdx} (*mdx*), apparues spontanément et portant une mutation non-sens dans l'exon 23, ce qui donnait lieu à une protéine tronquée. Toutefois, ce modèle ne récapitule pas totalement la maladie avec par exemple, une espérance de vie réduite seulement de 25 %. La souris $mdx^{\beta geo}$ (ou $Dmd^{mdx-\beta geo}$) a été créée via l'insertion d'un vecteur de « piège à gènes » ($ROSA\beta geo$) dans l'exon 63 du gène de la Dystrophine, ce qui entraîne la mutation de toutes les isoformes de cette protéine (Wertz and Füchtbauer, 1998). Ce modèle récapitule plusieurs aspects de la maladie dont les défauts musculaires squelettiques et cardiaques ainsi que des anomalies au niveau de l'œsophage. Cependant, le phénotype de ces souris est surtout visible lors du vieillissement de ces dernières. Il semblerait qu'un phénomène de compensation ait lieu entre la Dystrophine et l'Utrophine et l' $\alpha 7\beta 1$ -Intégrine, qui remplissent des fonctions similaires. Les souris ayant une double délétion de la Dystrophine et d'une de ces deux protéines sont significativement plus petites et présentent une maladie semblable voir pire que celle des patients atteints de DMD (pour une revue : *McGreevy et al., 2015*).

C. Rôle de SUMO dans la différenciation des myoblastes

1. Rôles controversés dans des modèles de différenciations musculaires

La fonction de SUMO dans la différenciation des myoblastes en myotubes *in vitro* a donné lieu à différents travaux dont les résultats sont contradictoires.

Plusieurs études plaident en faveur d'un rôle inhibiteur de la SUMOylation sur la différenciation des myoblastes en myotubes. Dans l'une d'elles, l'inhibition de la SUMOylation par un siRNA Ubc9 favorise la différenciation de la lignée myoblastique humaine C2C12 traitée avec du Bmp2 (« *Bone Morphogenetic Protein 2* »). Cette régulation serait due à la conjugaison de SUMO à la lysine 158 de Smad4 qui inhibe son activité transcriptionnelle (Yukita et al., 2012). Lors de travaux récents sur la glucotoxicité durant la différenciation des myoblastes, il a de nouveau été rapporté un rôle inhibiteur de SUMO sur la myogenèse. Un taux de glucose élevé accélère la myogenèse des cellules C2C12, certainement en raison de leur prolifération accrue ainsi qu'à des niveaux plus élevés de myogénine et de Set7/9 (« *SET domain containing lysine methyltransferase 7/9* »). Les myotubes formés ne sont toutefois pas fonctionnels et deviennent rapidement sénescents. Or, dans ces conditions, l'ajout d'acide anacardique, qui diminue les ROS cellulaires ainsi que l'abondance de protéines SUMOylées, améliore la qualité et la fonction de la myogenèse. De plus, cette étude montre que dans des conditions hyperglycémiques, SET7/9, impliqué dans l'assemblage et l'organisation des sarcomères, est surexprimé dès les premières phases de différenciation, et devient SUMOylé par SUMO-2/3 à des stades plus tardifs, ce qui n'est pas le cas en condition normale. Il semblerait que la SUMOylation de SET7/9 contrecarre la programmation génétique qu'il met en place habituellement, ce qui conduit à une structure désorganisée de sarcomères, un phénomène également décrit dans la cachexie (Liu et al., 2020; Nayak et al., 2019).

Une autre équipe décrit une réduction de la SUMOylation globale des cibles de SUMO-1 et SUMO-2/3 dans la lignée C2C12 au cours de leur différenciation, en adéquation avec les résultats précédents (Riquelme et al., 2006a). Toutefois, l'inhibition d'*Ubc9* altère la différenciation de ces cellules lors de l'étape terminale de la fusion. Cette observation, apparemment paradoxale par rapport aux travaux que nous venons de décrire, pourrait s'expliquer par le rôle majeur de SUMO dans la régulation des TFs liés à la myogenèse. En effet, comme nous allons le voir dans la partie suivante, de nombreux TF ayant des rôles

inhibiteurs ou activateurs de la myogenèse sont contrôlés par la SUMOylation. Comme pour de nombreux processus physiologiques, une régulation fine de la voie SUMO est nécessaire à son bon fonctionnement, ce qui explique l'implication de cette modification post-traductionnelle à différents niveaux de la myogenèse. Ainsi, selon le niveau d'hypoSUMOylation, la balance peut pencher vers un rôle inhibiteur ou activateur de SUMO dans la myogenèse.

Il semblerait de plus que SUMO ait un rôle dans l'organisation des sarcomères, mais aussi dans la régulation de protéines du cytosquelette (Nayak and Amrute-Nayak, 2020; Rosas-Acosta et al., 2005). Or, le remodelage du cytosquelette et la réorganisation des sarcomères sont des étapes importantes lors de la fusion des myoblastes. Cela pourrait expliquer pourquoi l'inhibition de la voie SUMO serait défavorable lors des étapes terminales de différenciation dans l'étude de Riquelme *et al.*.

2. Contrôle des facteurs impliqués dans la myogenèse

Bien que le rôle de la SUMOylation dans la myogenèse reste controversé du fait du nombre restreint d'étude *in vitro* et du manque de travaux *in vivo*, de plus en plus de données font état de son rôle dans la régulation des facteurs de transcription liés au processus de régénération musculaire.

Ainsi, il semblerait que la modification de Pax7 par SUMO soit essentielle dans sa fonction inhibitrice de la différenciation des myoblastes. En effet, une étude réalisée dans des cellules C2C12 montre que la forme Pax7 SUMO-déficiente Pax7K85R présente une différenciation accrue des myoblastes en myotubes, suggérant ainsi que le rôle inhibiteur de Pax7 dans la myogenèse repose sur sa SUMOylation, une caractéristique non-partagée avec Pax3 (Luan et Al., 2013).

De même, SUMO régule l'activité de plusieurs TFs de la famille MEF2, des activateurs transcriptionnels majeurs de la différenciation musculaire. Parmi ceux-ci, Mef2D est SUMOylé au niveau d'un motif hautement conservé à côté duquel se trouve un site invariant Ser-444 phosphorylé et essentiel pour la modification SUMO. La mutation S444A de même que le mutant SUMO-déficient K439R augmente l'activité myogénique de Mef2D. Il semble donc que la SUMOylation et la signalisation croisée avec la phosphorylation joue un rôle inhibiteur

de ce facteur et donc de la myogenèse. De la même manière, SUMO régule Mef2C ainsi que Mef2A, même si la phosphorylation ne semble pas être impliquée pour ce-dernier (Grégoire et al., 2006, 2006; Riquelme et al., 2006b).

Une autre preuve de l'activité inhibitrice de SUMO dans le processus de différenciation des myoblastes provient d'une étude sur Sharp-1, un inhibiteur de la myogenèse. Cette protéine agit comme un antagoniste de MyoD en inhibant son activité transcriptionnelle et, de ce fait, la différenciation des myoblastes. Sharp-1 est SUMOylé au niveau de deux résidus lysines hautement conservées, K240 et K255. Dans cette étude, les auteurs ont réalisés des doubles-mutants SUMO-déficients et ont montré que la SUMOylation de Sharp-1 était essentielle pour contrer efficacement la fonction de MyoD et la myogenèse et que ceci passait par le recrutement du co-répresseur G9a associé à la marque chromatinienne H3K9me2. Ces travaux sont intéressants à deux titres : (i) ils soulignent à la fois le rôle de SUMO dans la régulation de l'activité transcriptionnelle via son action sur l'accessibilité de la chromatine, et (ii) se situant dans la continuité des travaux sur la différenciation musculaire, il décrit de façon plausible le mécanisme par lequel SUMO régule ce processus (Wang et al., 2013b).

Toutefois, SUMO intervient aussi dans la régulation de MyoD *via* la SUMOylation d'HDAC1 (« *Histone Deacetylase 1* ») sur laquelle SUMO exerce une action duale. Dans des myoblastes indifférenciés, HDAC1, SUMOylé à un niveau basal, se lie à MyoD et inhibe ainsi son activité tandis que lors de la différenciation des myoblastes, l'augmentation de la SUMOylation d'HDAC1 induit sa dissociation de MyoD. MyoD n'est ainsi plus inhibé et peut activer ses gènes cibles (Joung et al., 2018).

De plus, une étude portant sur la régulation de la Myostatine semble attribuer un rôle activateur de SUMO sur cette protéine. La Myostatine est exprimée majoritairement par le muscle squelettique et agit de manière autocrine pour inhiber la prolifération, la différenciation et la synthèse des protéines des myoblastes. Or, la suppression du gène *Senp2* chez la Souris entraîne une baisse de son expression. Selon cette étude, *Senp2* favoriserait l'expression de la Myostatine et inhiberait la myogenèse *via* la déSUMOylation de Mef2A, conférant ainsi un rôle activateur myogénique de la SUMOylation dans ce processus. Ainsi, comme dans de nombreux processus cellulaires, SUMO agit à plusieurs niveaux dans la signalisation et peut avoir des fonctions opposées (Qi et al., 2014).

SUMO agit donc à différents niveaux de la myogenèse au cours de laquelle il semble jouer un rôle primordial. Toutefois, les connaissances à ce sujet restent incomplètes, font l'objet de controverses, et mériteraient d'être approfondies.

Objectifs de la thèse

Lors de cette introduction, nous avons pu appréhender le rôle majeur de SUMO à la chromatine et notamment son impact sur l'immunité innée et la plasticité cellulaire.

L'objectif de ma thèse est donc de décrypter le rôle chromatinien de la SUMOylation dans l'immunité innée et la plasticité cellulaire, mais en se focalisant sur ses implications dans les processus physiopathologiques associés. Cela comprend deux projets distincts.

Le premier vise à étudier l'impact d'une hypoSUMOylation induisant une réponse IFN-I dans le contexte des réponses immunitaires anti-tumorales, en se concentrant sur une synergie possible avec des inhibiteurs de point de contrôle, et le second à analyser le rôle de la SUMOylation sur la régénération tissulaire, en se focalisant sur la lignée musculaire.

Le premier projet englobe un aspect *in vitro* faisant suite à la découverte qu'une hypoSUMOylation dans les cellules myéloïdes entraînait une forte réponse interféron de type I. SUMO réprimerait l'expression du gène *Ifnb1* via une région distale de celui-ci, mais le mécanisme exact n'est pas encore connu. Afin de découvrir les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la fonction de SUMO dans l'immunité innée, un volet de mon premier projet vise à définir le répertoire des substrats SUMO endogènes dont les niveaux de SUMOylation varient selon l'action du système immunitaire innée et devraient donc jouer un rôle dans la réponse inflammatoire. L'autre aspect de ce projet est réalisé *in vivo* et consiste à tester si la réponse IFN-I engendrée par l'hypoSUMOylation agit en synergie avec l'immunothérapie PD-1/PDL-1 et de comprendre le mécanisme associé.

Mon deuxième projet s'attache à évaluer le rôle de la SUMOylation dans le devenir des cellules satellites au cours du programme myogénique *ex vivo* et *in vivo* et à analyser sa contribution au cours du processus de régénération lorsque le muscle est soumis à des dommages aigus ou chroniques.

Résultats

I. SUMOylome

A. Contexte général de l'étude

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, des études réalisées au laboratoire ont montré que SUMO agissait comme un répresseur majeur de l'expression génique au cours de la réponse inflammatoire et jouait donc un rôle important au cours de la réponse immunitaire innée (Decque et al., 2016). Ainsi, une perte de la SUMOylation dans des BMDCs induit une réponse massive d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires lors de stimulations reproduisant des infections virales ou bactériennes. Cette réponse est à la fois beaucoup plus importante et beaucoup plus longue que celle induite chez les cellules SUMO-suffisantes. Il a également été démontré que cette réponse passait par l'inhibition de l'expression du gène *Ifnb1* via des locus de régulation distaux, en particulier de la région située 15 kb en amont de ce gène. Le mode d'action de SUMO sur la fonction *enhancer* la région -15kb et sur les substrats associés à ce locus reste toutefois mal connu.

Afin de tenter de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à la fonction de SUMO dans la réponse immunitaire innée lors d'une stimulation pathogénique, nous avons employé une méthode innovante et non-biaisée de spectrométrie de masse permettant l'identification endogène d'un répertoire de substrats SUMO. Ce projet a été réalisé en collaboration avec Ivo Hendriks et a donné lieu à la première analyse de SUMOylomes de macrophages murins en conditions non-stimulée ou stimulée avec du LPS ou du poly(I:C), respectivement mimétiques des infections bactériennes et virales.

B. Présentation et validation du modèle d'étude

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer dans notre modèle la réponse interféron de type I massive obtenue après perte de la voie SUMO. Les travaux de Decque *et al* se focalisaient en effet sur des cellules dendritiques totalement dépourvues de SUMOylation tandis que nos expériences concernent une lignée de macrophages murins (Raw 264.7) traitée ou non par un inhibiteur spécifique de la voie SUMO, le ML-792, afin d'induire une hypoSUMOylation globale. Plus précisément, les cellules sont séparées en deux groupes,

traitées ou non avec 2,5 μ M de ML-792 afin d'inhiber la SUMOylation des substrats. Les cellules sont ensuite soit non-stimulées (NS), soit stimulées avec 10 ng/ml de LPS pendant 1h ou avec 20 μ M/ml de poly(I:C) pendant 2h afin de regarder la réponse précoce à une infection. Le LPS, exprimé à la surface des bactéries Gram-négatives, mime une infection bactérienne et est reconnu par le récepteur extracellulaire TLR4, entraînant l'activation de la voie NF-kB et interféron de type I (Lu et al., 2008). Le poly(I:C), qui mime une réponse virale, est un ARN double brin (dsRNA) reconnu par TLR3 et induisant principalement une réponse IFN-I (Matsumoto and Seya, 2008). Les échantillons sont récoltés 24h après traitement par le ML-792 (**Figure 35A**).

Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité du ML-792 à l'aide d'un Western-blot SUMO-2/3 dans nos différentes conditions. Comme attendu, le profil caractéristique des substrats totaux SUMOylés, visible dans les cellules non-traitées, disparaît complètement sous traitement ML-792, tandis que la forme libre de SUMO-2/3 augmente (**Figure 35B**). Nous avons donc validé l'efficacité du ML-792 dans notre lignée cellulaire.

Nous avons ensuite voulu reproduire la réponse interféron de type I et inflammatoire observée par Decque *et al.* . Pour cela, nous avons traité les cellules avec ou sans ML-792 puis nous les avons stimulées sur des périodes de temps croissantes (de 15 minutes à 6 heures) par du LPS et du poly(I:C). Chacun des échantillons a été ensuite soumis à une transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR). Tout comme les résultats obtenus dans les BMDCs, les cellules ayant reçues du ML-792 répondent après des stimulations plus courtes par le LPS par une expression massive et de longue durée de l'expression du gène *Ifnb1* par rapport aux cellules non-traitées (**Figure 35C**). Cependant, une expression basale presque dix fois plus élevée que la condition sans ML-792 est observable dans les cellules hypoSUMOylées. Le pic d'expression d'*Ifnb1* est atteint au bout de 4h et reste stable dans les cellules hypoSUMOylées tandis qu'il diminue rapidement dans les cellules WT. Ce pic est environ 70 fois plus élevé dans les cellules hypoSUMOylées par rapport aux cellules SUMO-suffisantes stimulées. En comparaison avec les cellules non-stimulées et n'ayant pas reçu l'inhibiteur, cette expression est environ 30000 fois plus élevée. Bien que cette augmentation soit moins impressionnante sous stimulation par poly(I:C), une expression plus importante et plus durable de l'*Ifnb1* est également induite sous hypoSUMOylation (**Figure 35J**).

L'expression de gènes de réponse à l'interféron de type I (*Isg15*, *Mx1*, *Ifit2* et *Usp18*), de gènes de la voie de l'IFN-I tels que *Irf7* et de cytokines pro-inflammatoires (*IL-6*) est

également plus importante sous ML-792 lors de stimulation par LPS (**figure 35D-I**). Usp18 agit en tant que régulateur négatif de la réponse immunitaire innée. L'augmentation de son expression sous ML-792 démontre ainsi qu'une tentative de régulation de la réponse immunitaire exacerbée est mise en place sous hypoSUMOylation. L'expression des gènes de réponse à l'IFN-I et des gènes de cette voie semble aussi amplifiée sous hypoSUMOylation lors de stimulation par poly(I:C) (**Figure J-L**).

Ces données nous ont donc permis de confirmer l'induction d'une réponse massive par l'interféron de type I dans les RAW 264.7 sous stimulation LPS et poly(I:C) lors d'une hypoSUMOylation globale établie grâce au ML-792, validant ainsi notre modèle.

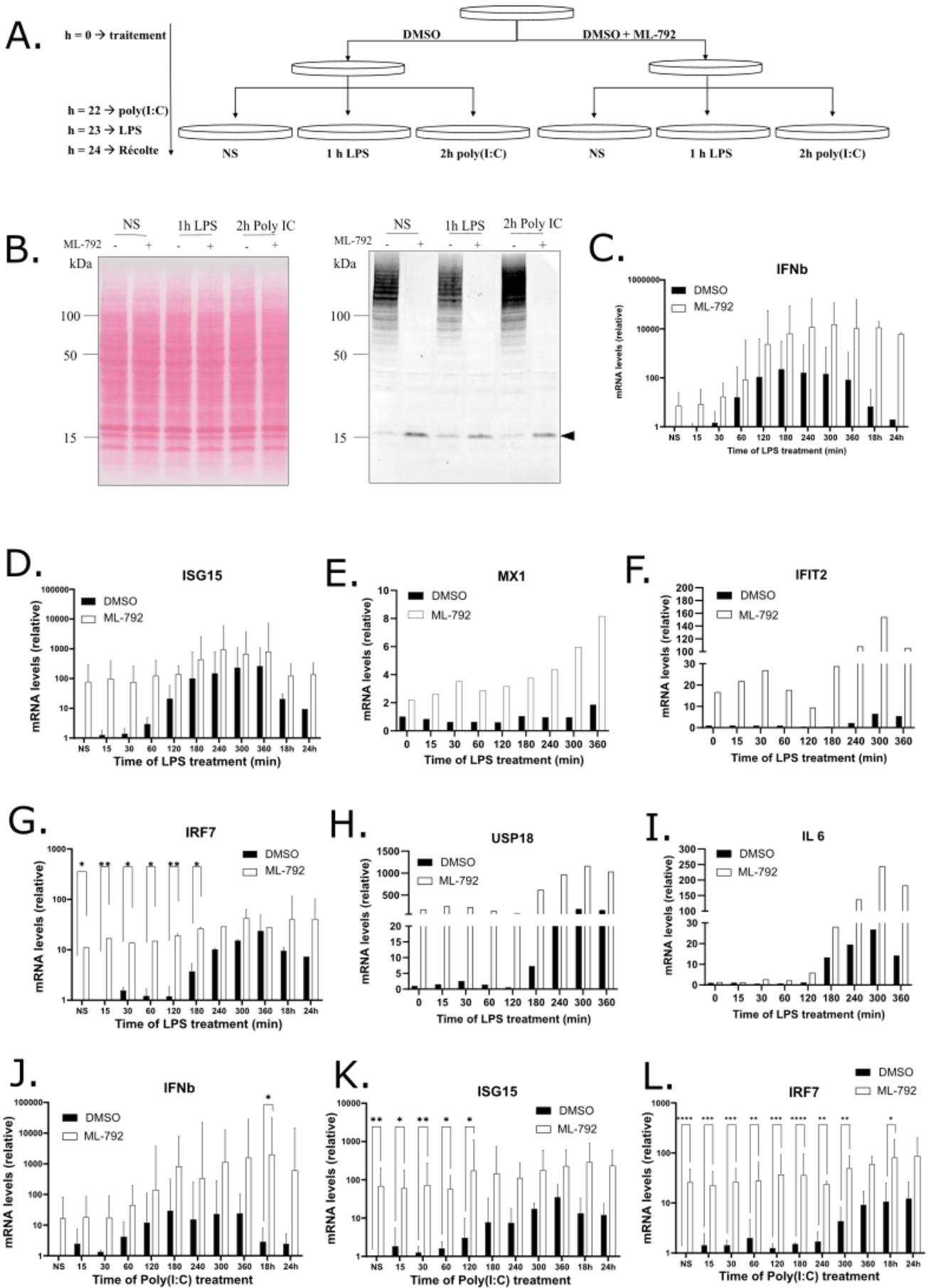


Figure 35 : Validation de la réponse massive IFN-I induite par l'hypoSUMOylation provoquée par le ML-792.

(A) Schéma du protocole employé dans nos expériences. Les cellules sont d'abord séparées en deux groupes, traitées ou non avec du ML-792, puis sont soit non-stimulées (NS), soit stimulées avec 1h de LPS (1h LPS) ou avec 2h de poly(I:C) (2h poly(I:C)). La récolte de l'ensemble des groupes est réalisée 24h après traitement par le ML-792.

(B) Western-blot SUMO-2/3 réalisé dans des RAW 264.7 après 24h de traitement au ML-792 en conditions non-stimulées ou stimulées avec 1h de LPS ou 2h de poly(I:C). La flèche noire représente la fraction de SUMO-2/3 libre.

(C-I) Analyse quantitative en RT-qPCR de l'ARNm de l'*Ifnb1* dans les RAW 264.7 avec ou sans ML-792 sous des durées croissantes de LPS, normalisée par rapport aux cellules non traitées (0 min LPS sans ML-792) (C), ainsi que de l'ARNm d'*Isg15* (D), de *Mx1* (E), d'*Ifit2* (F), d'*Irf7* (G), d'*Usp18* (H) et de l'*IL-6* (I).

(J-L) Analyse quantitative en RT-qPCR de l'ARNm de l'*Ifnb1* dans les RAW 264.7 avec ou sans ML-792 sous des durées croissantes de poly(I:C), normalisée par rapport aux cellules non traitées (0 min LPS sans ML-792) (J), ainsi que de l'ARNm d'*Isg15* (K), et d'*Irf7* (L).

C. Validation des SUMOylomes endogènes de macrophages murins

La technique de spectrométrie de masse non-biaisée employée par Ivo Hendriks pour réaliser nos SUMOylomes est récente et innovante. Outre sa capacité à étudier les substrats endogènes, elle nous permet de définir avec précision les sites protéiques modifiés. Cela a été rendu possible grâce à l'amélioration de plusieurs étapes du processus. Pour résumer rapidement cette méthode, l'ensemble des protéines est soumis à une première digestion par l'enzyme Lys-C. Contrairement à la trypsine que l'on employait avant, elle permet de conserver l'épitope reconnu par l'anticorps anti-SUMO-2/3 et ainsi d'insérer une étape intermédiaire d'enrichissement par immunoprécipitation de SUMO-2/3. De plus, la Lys-C reste active en conditions dénaturantes ce qui permet de travailler dans des conditions favorables à l'inactivation des hydrolases de SUMO. Après une étape d'enrichissement peptidique, les fragments contenant les sites SUMO sont donc précipités avec un anticorps anti-SUMO-2/3. Une deuxième étape de digestion avec Asp-N est ensuite réalisée afin de réduire la taille des peptides contenant SUMO-2/3, permettant ainsi l'identification des peptides liés à SUMO en spectrométrie de masse (Figure 36A).

Afin de mieux appréhender le mode d'action de SUMO lors de la réponse immunitaire innée suivant une stimulation pathogène, nous avons entrepris de réaliser les SUMOylomes endogènes de macrophages murins en condition non-stimulée ou stimulée avec 10ng/ml de LPS pendant 1h (1h LPS) ou 20 μ M/ml de poly(I:C) pendant 2h. Toutes les expériences de culture cellulaire ont été réalisées en *quadruplicata*, eux-mêmes analysés en six fractions (**Figure 36B**).

L'intensité de l'ensemble des sites SUMO2/3 identifiés dans cette étude est similaire entre les différentes conditions (**Figure 36C**). De plus, l'analyse par corrélation de Pearson montre une reproductibilité très élevée entre les réplicats de chaque condition, mais aussi entre les différentes conditions expérimentales (**Figure 36D**). Ces données démontrent un effet biologique mineur des traitements LPS et poly(I:C) dans le contexte du SUMOylome complet de ces cellules.

Au total, les SUMOylomes nous ont permis d'identifier 3 630 sites SUMO-2/3, cartographiés sur 1 232 protéines cibles de la voie SUMO dont uniquement 99 sont différentiellement exprimées, toutes conditions confondues.

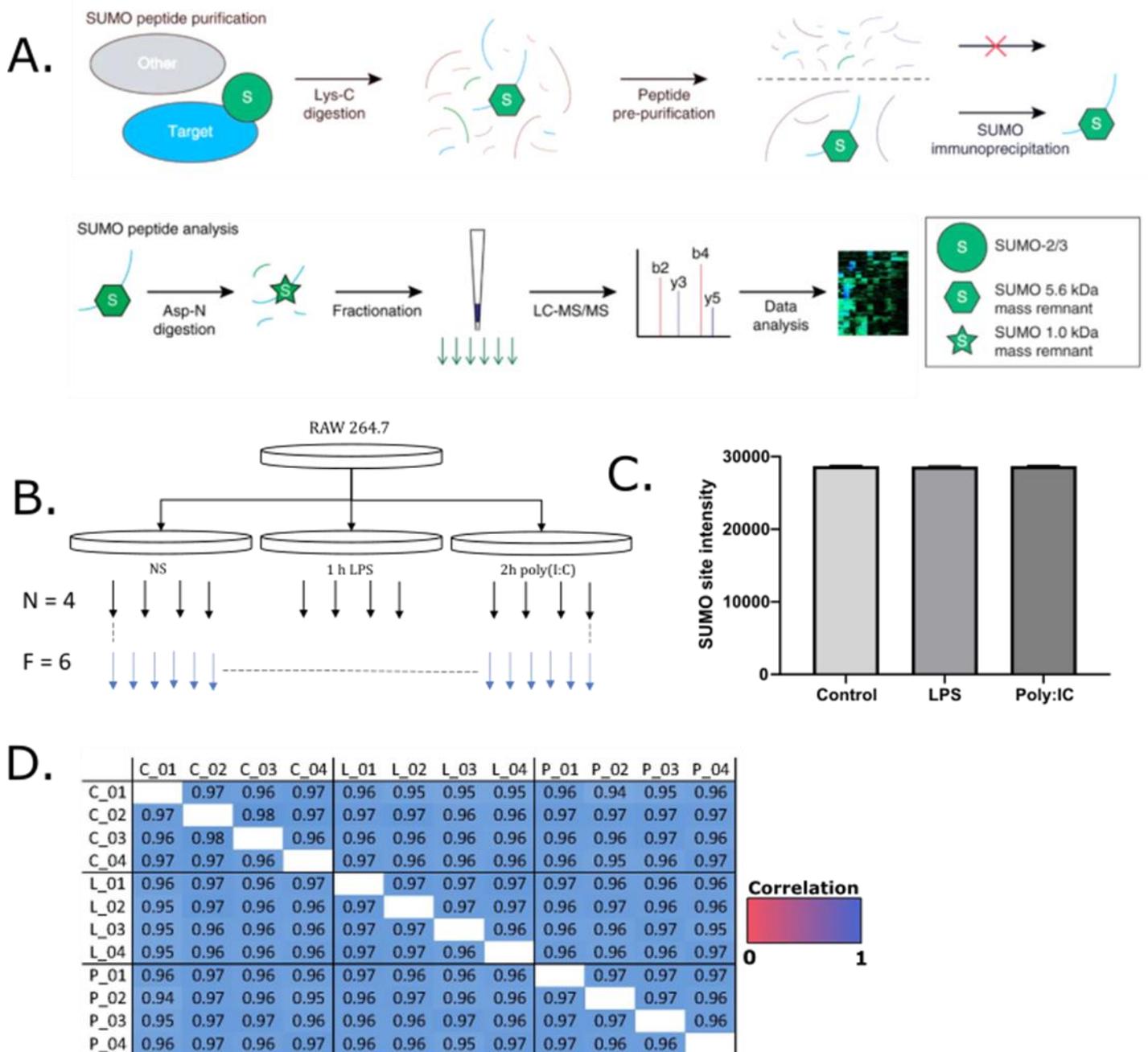


Figure 36 : Résumé et validation de la technique utilisée pour les SUMOylomes endogènes.

(A) Schéma du protocole employé pour réaliser les SUMOylomes endogènes. Les protéines sont d'abord digérées avec l'enzyme Lys-C. Après une première étape d'enrichissement, les peptides sont précipités avec un anticorps dirigé contre SUMO-2/3 puis subissent une deuxième étape de digestion avec l'enzyme Asp-N permettant la réduction de la taille des fragments contenant SUMO-2/3. Les peptides SUMO sont donc ensuite facilement identifiés en spectrométrie de masse. LC-MS = chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse. Adapté de *Lumpkin et al., 2017*.

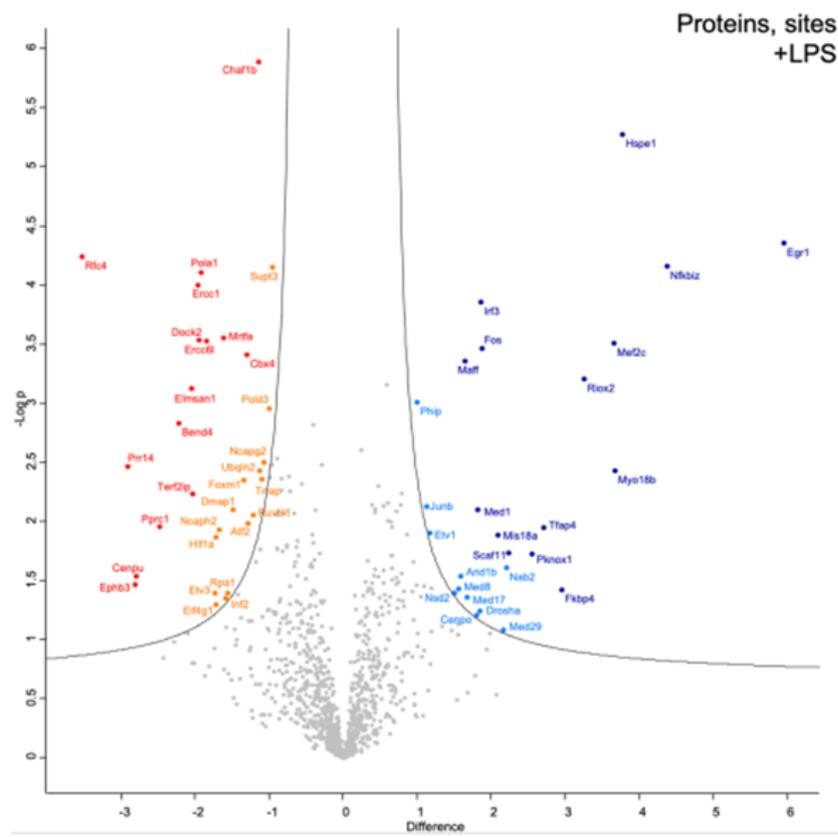
(B) Schéma du protocole expérimental employé pour la réalisation du SUMOylome dans les Raw 264.7 en conditions non-stimulée (NS), stimulée avec du LPS (1h LPS) ou du poly(I:C) (2h poly(I:C)). Toutes

les expériences de culture cellulaire ont été réalisées en quadruplicat et analysées en six fractions pour chaque réplicat.

(C) Aperçu de l'intensité de l'ensemble des sites SUMO2/3 identifiés dans cette étude entre les différentes conditions.

(D) Visualisation de la corrélation de Pearson entre les SUMOylomes Contrôles (C), LPS (L) et Poly(I:C) (P). Les chiffres 01 à 04 correspondent aux quatre réplicats par condition.

A.



B.

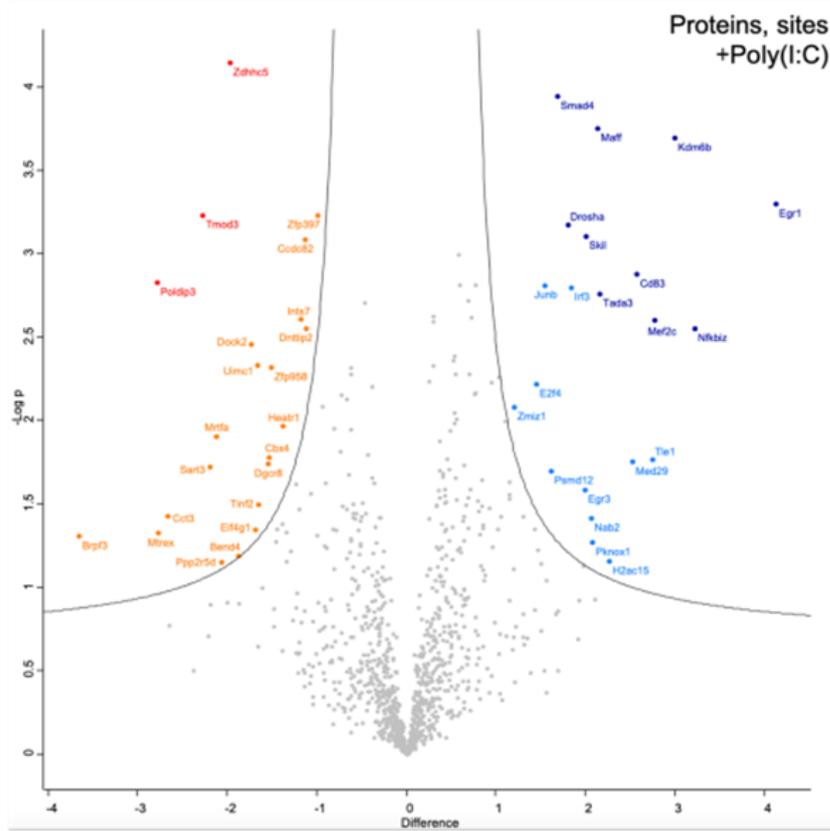


Figure 37 : Volcano plot des protéines différentiellement SUMOylées sous stimulations pathogéniques.

(A) Volcano plot des protéines différentiellement SUMOylées sous stimulation LPS.

(B) Volcano plot des protéines différentiellement SUMOylées sous stimulation poly(I:C).

La différence représentée sur l'axe x correspond au rapport du niveau de SUMOylation lors de la stimulation par LPS ou poly(I:C) sur le niveau de SUMOylation des cellules contrôles non stimulées. L'axe y correspond au logarithme de la *p-value*. Plus une protéine s'éloigne du centre de l'axe x, et plus elle est différentiellement SUMOylée, plus elle se situe haut au niveau de l'axe y, et plus cette différence est statistiquement significative.

Comme le laissait présager la corrélation de Pearson, le nombre de protéines différentiellement SUMOylées entre les conditions est peu élevé. Après 1h de stimulation LPS et en comparaison avec la condition non-stimulée, 26 protéines sont hyperSUMOylées (en bleu clair/foncé sur la figure) et 30 sont hypoSUMOylées (en rouge/orange sur la figure) de manière significative avec un taux de fausses découvertes (FDR) inférieur à 15 % (FDR < 15 % : *fold change* >2 et *p-value* <0.05) (**Figure 37A**). Après 2h de stimulation poly(I:C) lorsque l'on compare avec la condition non-stimulée, 21 protéines sont hyperSUMOylées et 22 sont hypoSUMOylées de manière significative (FDR < 15%) (**Figure 37B**).

D. Analyse des substrats différentiellement hyperSUMOylés

Afin de valider nos substrats et de comprendre le rôle de leur SUMOylation dans la réponse immunitaire observée après stimulations pathogéniques, nous avons étudié spécifiquement certains d'entre eux. Les substrats dont la SUMOylation augmente sous stimulation sont presque exactement les mêmes sous stimulation LPS ou poly(I:C). Par souci de clarté, nous avons donc choisi de ne représenter principalement que les données obtenues sous LPS, mais la caractérisation fonctionnelle de ces substrats a été réalisée à chaque fois dans les trois conditions initiales.

Le SUMOylome des macrophages soumis à la stimulation LPS révèle donc 26 protéines hyperSUMOylées dont 15 avec un FDR < 5% (*fold change* >3, *p-value* <0.001), représentées en bleu foncé ; et 11 avec un FDR < 15% (*fold change* >2 et *p-value* <0.05), représentées en bleu clair (**Figure 38A**).

Nous avons décidé de nous intéresser spécifiquement aux protéines dont l'expression variait également lors d'une stimulation avec 1h de LPS en corrélant les données de notre SUMOylome avec celui d'un transcriptome réalisé dans des conditions similaires hormis la quantité de LPS de 100 ng/ml au lieu de 10 ng/ml. (Eichelbaum and Krijgsveld, 2014). Le diagramme de Venn représente le nombre de cibles SUMO dynamiques et de protéines différentiellement exprimées sous 1h de stimulation LPS (15% FDR = : *fold change* >2 et *p-value* <0.05) (**Figure 38B**). Il met en avant 4 protéines dont l'expression corrèle positivement avec l'augmentation de la SUMOylation et ayant un FDR inférieur à 5% : Egr1, Nfkbiz, Fos et Maff ; ainsi qu'une protéine dont l'expression corrèle positivement avec l'augmentation de la SUMOylation et ayant un FDR inférieur à 15% : JunB (**Figure 38C**). Nous avons ensuite voulu voir comment ces protéines étaient connectées entre elles grâce au logiciel *String Bioinformatics*. Les réseaux obtenus sous LPS et poly(I:C) nous ont permis de mettre en évidence un lien étroit entre ces protéines, excepté pour Nfkbiz (**Figure 38D**). Enfin, la représentation graphique des protéines les plus différentiellement hyperSUMOylées sous LPS (FDR < 15%) nous permet de voir que les deux protéines les plus différentiellement SUMOylées sont Egr1 et Nfkbiz, tandis que les trois autres cibles dont l'expression varie sous LPS se situent plus loin dans le classement (**Figure 38E**).

Sous l'effet de divers signaux mitogènes, l'expression de certains facteurs de transcription est induite sans nécessité de synthèse protéique *de novo*. En effet, leur transcription peut avoir lieu en présence d'inhibiteurs de synthèse protéiques, ce qui signifie que les protéines nécessaires à leur expression, dont les facteurs de transcription, sont disponibles et ne nécessitent pas de synthèse préalable. Cela fait de ces FTs des médiateurs précoces de la réponse à la signalisation extracellulaire. Egr1 (« *early growth response-1* »), JunB et c-Fos font partie de cette catégorie de FTs, ce qui explique leur expression dynamique sous 1h de LPS (Banerji and Saroj, 2021; Sukhatme, 1990). Egr1 est un FT de la famille des protéines à doigt de zinc dont les effets cellulaires connus sont divers, variés et contexte-dépendant, allant de la prolifération et différenciation des cellules à un effet suppresseur de tumeur et inducteur de l'apoptose. Il a été démontré qu'en réponse à l'EGF, Egr1 était conjugué à SUMO-1 *in vivo* et que cela améliorerait son renouvellement en favorisant son ubiquitination et sa dégradation médiée par le protéasome (Manente et al., 2011). Or, comme le montre la figure 38E, Egr1 est la protéine la plus différentiellement hyperSUMOylée par SUMO-2/3 à la fois lors d'une stimulation par LPS et par poly(I:C). Nous cherchons donc à valider sa modification par SUMO-2/3, ce qui n'a jamais été prouvé, et à voir par Western-blot l'évolution

de la fraction SUMOylée par rapport à la fraction Egr1 non-SUMOylée. Cependant, lorsque l'on classe les protéines par leur niveau absolu de SUMOylation dans la condition contrôle, Egr1 n'est que le 818ème substrat. Ce rang remonte au 175ème sous LPS, et à 326 sous poly(I:C). Bien que très différentiellement SUMOylée par SUMO-2/3, son niveau absolu de SUMOylation est donc relativement faible, ce qui rend difficile l'observation de sa forme endogène par Western-blot direct. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation de SUMO-2/3 suivit d'un Western-blot contre Egr1, afin d'enrichir la fraction de substrats SUMOylés à l'aide d'un protocole spécifique pour SUMO-2/3 endogène (Barysch et al., 2014). Dans un premier temps, nous avons appliqué ce protocole à Egr1 en condition poly(I:C) (**Figure 38G**). L'immunoprécipitation SUMO-2/3 a fonctionné correctement, on retrouve peu de fractions SUMOylées dans le surnageant des billes couplées à l'anticorps SUMO-2/3, et un bon enrichissement dans l'éluat (**Figure sup 1**). Le blot Egr1 révèle une bande à environ 70 kDa correspondant à Egr1 (flèche blanche), ainsi qu'une bande migrant au poids moléculaire attendu d'environ 90 kDa (flèche noire) et qui disparaît après traitement par ML-792 dans les échantillons immunoprécipités avec SUMO-2/3. Cette bande correspondrait ainsi à SUMO-Egr1. Nous avons donc montré pour la première fois qu'Egr1 était modifiée par SUMO-2/3, confirmant ainsi les résultats obtenus par le SUMOylome.

Bien que ce protocole nécessite d'être amélioré, nous avons réussi à mettre en place une technique fonctionnelle pour observer les fractions SUMOylées de substrats ayant un niveau absolu de SUMOylation faible. Cette technique nous permettra de comparer l'évolution de la la fraction SUMOylée Egr1 par rapport à l'expression de la protéine dans les différentes conditions, et de valider d'autres candidats du SUMOylome dont les Western-blot directs ne suffisent pas à observer la fraction modifiée par SUMO-2/3.

Maff est un facteur de transcription de type bZip (« *basic region leucine zipper* ») appartenant à la famille MAF. Cette protéine ne possède pas de domaine de transactivation mais peut agir soit sous forme d'homodimère, soit sous forme d'hétérodimère avec des protéines possédant une activité effectrice (Katsuoka and Yamamoto, 2016). Il a été démontré que Maff joue un rôle dans le processus inflammatoire des cellules myométriales en régulant positivement la production de cytokines (Saliba et al., 2019). La SUMOylation de Maff n'a encore jamais été documentée dans la littérature, mais MafG, un autre membre de la famille MAF, est SUMOylé sous sa forme d'homodimère, ce qui entraîne une répression active de l'expression de ces gènes cibles (Motohashi et al., 2006). Bien que Maff ne soit que le 20^{ième} substrat différentiellement SUMOylé entre les conditions non-stimulées et LPS, son niveau

absolu de SUMOylation est plus élevé qu'Egr1, avec un classement de 334 en condition contrôle, de 192 sous LPS et de 159 sous poly(I:C). Nous avons donc pu observer la fraction SUMOylée endogène de Maff à l'aide d'un blot Maff direct (**Figure 38F**, flèche noire). La bande Maff SUMOylée en condition poly(I:C) semble être augmentée tandis que sa forme non modifiée reste identique entre les différentes conditions. Cela n'est pas observé sous LPS, probablement parce que l'hyperSUMOylation de Maff est plus faible dans cette condition. En plus de montrer pour la première fois la modification de Maff par SUMO-2/3, ces résultats valide donc les données du SUMOylome.

Après avoir validé la SUMOylation de Maff, nous avons décidé de réaliser des analyses plus fonctionnelles afin de comprendre comment sa modification par SUMO impacte son mode d'action. Nous avons dans un premier temps récupéré et examiné des données de ChiP-seq Maff déjà publiées (Garber et al., 2012). Nous avons pu constater que Maff était présent au site -15kb de l'*Ifnb1* et était progressivement relargué lors de stimulations de durées croissantes avec du LPS, laissant ainsi supposer un rôle répresseur de Maff sur ce gène (**Figure 39A**). Sa forme SUMOylée augmentant également, et même de manière plus importante que son expression sous poly(I:C), on suppose donc que la SUMOylation de Maff favoriserait son activité répresseur à la chromatine. Une hypoSUMOylation favoriserait donc davantage son détachement de la chromatine, voire entraînerait sa disparition totale au niveau de ce locus, ce qui entraînerait une production augmentée d'IFN- β en condition basale, et massive sous LPS.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un ChiP-seq de Maff en condition non-stimulée, stimulée avec 1h de LPS ou 2h de poly(I:C), avec ou sans ML-792. Toutefois, l'enrichissement de Maff n'étant pas suffisant et la variabilité entre les réplicats trop importante, il nous a été impossible de distinguer les pics Maff du bruit de fond, et donc de conclure sur le rôle de Maff au niveau de la région -15kb de l'*Ifnb1* et des gènes de réponse à l'interféron de type I (**Figure 39B**). Ces expériences sont actuellement en train d'être répétées.

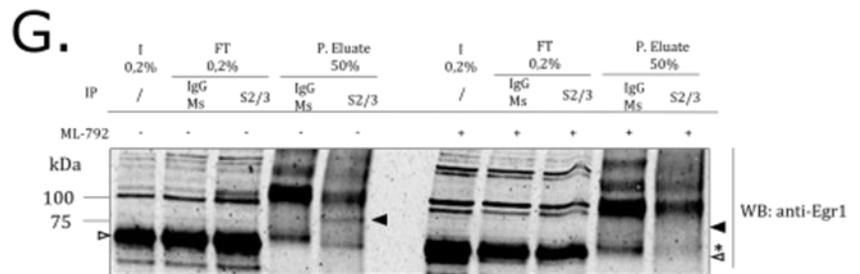
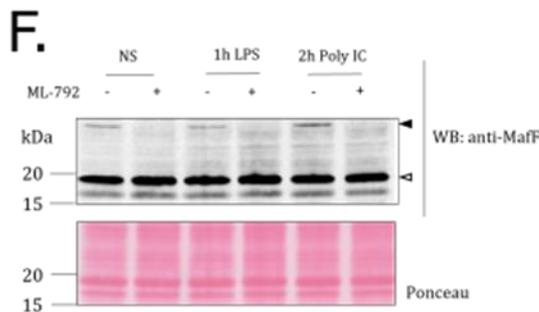
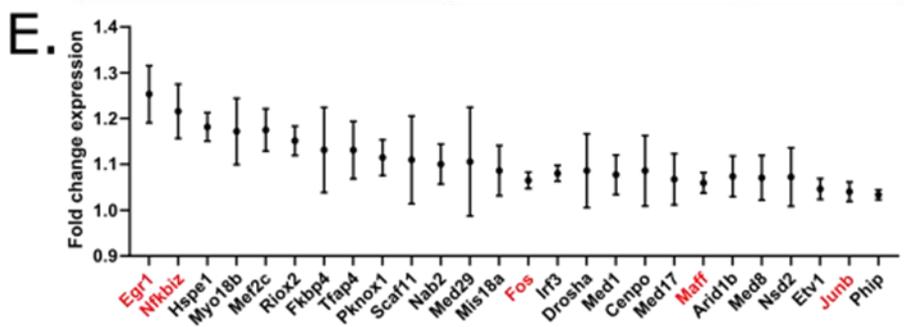
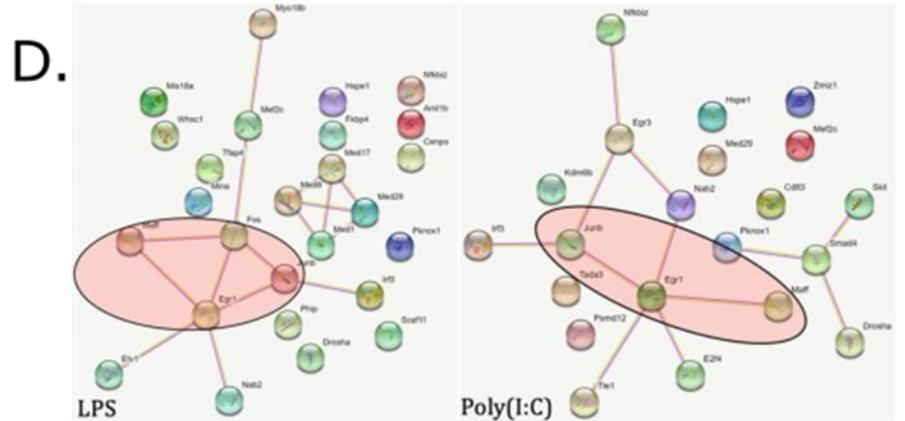
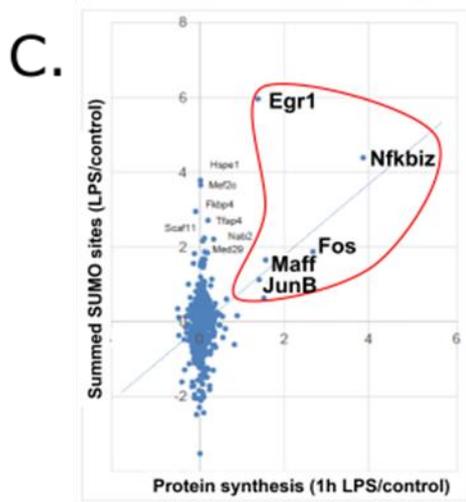
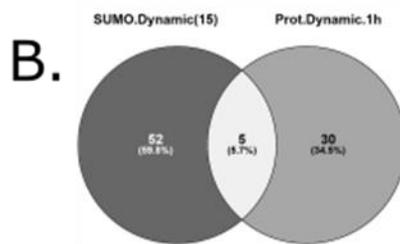
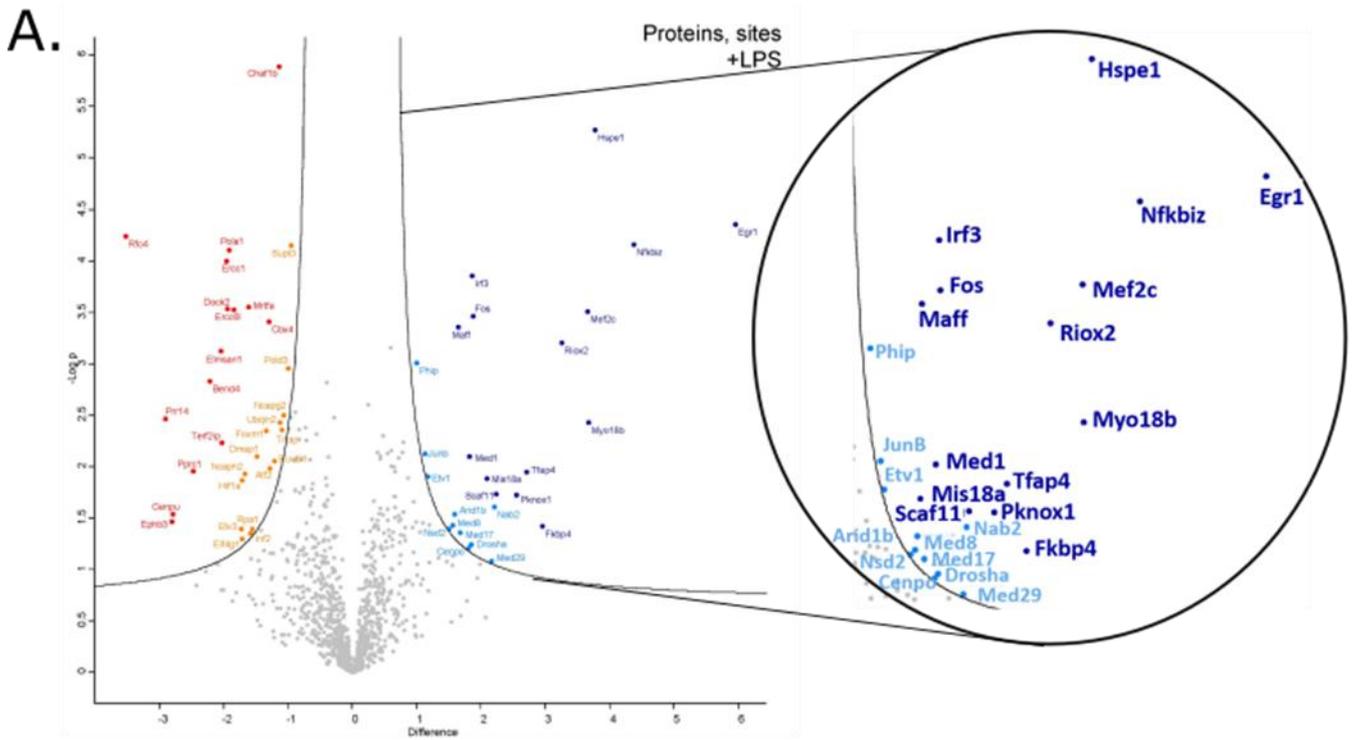


Figure 38 : Substrats différentiellement hyperSUMOylés sous stimulations LPS et poly(I :C).

(A) *Volcano plot* des protéines hypoSUMOylées (en rouge et orange) et hyperSUMOylées (en bleu) lors d'une stimulation par LPS, et zoom sur les protéines différentiellement hyperSUMOylées. La différence représentée sur l'axe x correspond au rapport du niveau de SUMOylation lors de la stimulation par LPS sur le niveau de SUMOylation des cellules contrôles non stimulées. L'axe y correspond au logarithme de la *p-value*. Plus une protéine s'éloigne du centre de l'axe x, et plus elle est différentiellement SUMOylée, plus elle se situe haut au niveau de l'axe y, et plus cette différence est statistiquement significative.

(B) Diagramme de Venn des cibles SUMO dynamiques et de protéines différentiellement exprimées sous 1h de stimulation LPS (15% FDR = : *fold change* >2 et *p-value* <0.05).

(C) Représentation graphique de la corrélation entre l'expression et la SUMOylation des protéines après 1h de stimulation LPS.

(D) Réseaux de protéines significativement hyperSUMOylées après stimulation par LPS ou poly(I :C). Ces réseaux ont été créés à l'aide du logiciel en ligne *String Bioinformatics*, sur la base du « *textmining* » et « *experimentation* ».

(E) Représentation graphique des protéines les plus différentiellement hyperSUMOylées sous LPS (15% FDR = : *fold change* >2 et *p-value* <0.05). Les protéines en rouge correspondent aux protéines dont l'expression varie également sous stimulation avec 1h de LPS.

(F) Western Blot Maff réalisé dans des RAW 264.7 après 24h de traitement au ML-792 en conditions non-stimulée ou stimulée avec 1h de LPS ou 2h de poly(I:C).

(G) Western Blot Egr1 après immunoprécipitation SUMO-2/3 ou IGG. I 0,2% = 0,2% *Input*, FT 0,2% = 0,2% *Flow through* (surnageant récupéré après incubation avec les billes liées à l'anticorps), et *P. Eluate* 50% = 50% de l'éluat précipité que l'on obtient après l'élution peptidique.

Les flèches blanches désignent les substrats non-SUMOylés, et les flèches noires les substrats SUMOylés. Les bandes spécifiques sont marquées par des astérisques.

En parallèle, nous avons voulu étudier l'impact d'une perte de SUMOylation spécifique à Maff en créant une protéine Maff mutée au niveau de son site SUMO-accepteur. Maff possède en effet un site consensus de SUMOylation conservé entre de nombreuses espèces (**Figure 39C**) La lysine receveuse en position 14, située au niveau de ce site, est désignée par le SUMOylome comme étant la cible de l'hyperSUMOylation observée. A partir d'un vecteur d'expression pcDNA-Maff WT dans lequel l'insert est exprimé sous le contrôle d'un promoteur T7, nous avons donc effectué une mutagenèse dirigée afin de transformer la lysine 14 de Maff en arginine (K14R) et le glutamate en position 16 en alanine (E16A). Les mutations ont été

confirmées par séquençage et le niveau d'expression de chaque vecteur devra par la suite être vérifié dans les Raw264.7 transfectées avec la construction et la machinerie SUMO (données non présentées). L'efficacité de la mutation sur la modification par SUMO de Maff sera ensuite vérifiée par Western-blot. La bande SUMOylée devrait alors disparaître de la même manière que ce qui est observé sous ML-792.

Toujours dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action de Maff et de sa SUMOylation au locus -15kb, nous avons conçu une expérience de rapporteur Luciférase, basée sur celle employée par Decque et al (Decque et al., 2016). Afin de mettre au point la technique, nous avons utilisé deux rapporteurs luciférase disponibles au laboratoire, une contenant le promoteur *Ifnb1* en amont du gène de la luciférase (NR1), et une avec le promoteur *Ifnb1* et le site -15kb en amont du promoteur (SIRE1). Ces rapporteurs ont été transfectés dans des Raw264.7 stimulées ou non avec du LPS en présence ou non de ML-792. Comme attendu, nous pouvons constater une augmentation de l'expression de la Luciférase, et donc de l'*Ifnb1*, lorsque l'on transfecte les cellules avec SIRE1 en comparaison avec les cellules transfectées avec NR1. De même, l'ajout de LPS dans les cellules sans ML-792 double l'expression de l'*Ifnb1* dans les cellules transfectées avec SIRE1 ($p < 0,0001$). Toutefois, contrairement à ce qui était attendu, aucune différence n'est à noter entre les cellules non-stimulées transfectées avec SIRE1 en présence ou en absence de ML-792. Une diminution significative de l'expression de l'*Ifnb1* est même observée dans les cellules transfectées avec SIRE1 et stimulées avec du LPS en présence de ML-792 ($p = 0,0033$). Une des probables explications à cette apparente contradiction est la différence du taux de SUMOylation. En effet, le ML-792 induit une hypoSUMOylation sévère (**Figure 35B**), tandis que le modèle employé par Decque et al. entraînait une hypoSUMOylation modérée (Decque et al., 2016). Une hypoSUMOylation trop forte peut, de manière cellule et contexte-dépendant, mener à l'inverse de l'effet attendu comme nous en discuterons plus tard. Cela peut être dû au niveau de SUMOylation qui diffère d'un substrat à l'autre et va donc donner lieu à une sensibilité différente à l'hypoSUMOylation, mais aussi aux interconnexions entre les différentes voies moléculaires activées lors du stress cellulaire qu'induit un trop faible niveau de SUMOylation globale.

Cependant, l'objectif final du test rapporteur est de visualiser l'effet de l'hypoSUMOylation spécifique de Maff au locus -15kb de l'*Ifnb1* grâce aux constructions Maff mutées au niveau du site SUMO. Nous quantifierons l'activité de l'*enhancer* -15kb en présence de Maff WT ou SUMO-déficient au cours des conditions non-stimulée ou stimulée avec du

(C) Alignements de séquences d'acides aminés de Maff humain, de souris, de rat, de cochon et de poulet. Le motifs consensus SUMO et la région homologue étendue sont indiqués par des cadres. Les mutations induites K14R et E16A sont représentées respectivement en rouge et vert au niveau des résidus désignés par les flèches de la même couleur.

(D) Analyse fonctionnelle de l'activité luciférase d'une région contrôle négative (NR1), et de la région située en -15kb de l'*Ifnb1* (S-IRE1) placés sous un promoteur *Ifnb1*, au sein de cellules RAW264.7 non-stimulées (NS), ou stimulées avec 6h de LPS (LPS) en présence ou non de 8h de ML-792. Les résultats sont normalisés à ceux de l'activité de la luciférase *renilla*.

E. Analyse des substrats différentiellement hypoSUMOylés

En parallèle de la validation et de la caractérisation fonctionnelle des substrats différentiellement hyperSUMOylés, nous nous sommes intéressés aux substrats dont la SUMOylation suivait le mouvement inverse sous LPS.

Le SUMOylome des macrophages soumis à la stimulation LPS révèle 30 protéines différentiellement hypoSUMOylées dont 15 avec un FDR < 5% (*fold change* >3, *p-value* <0.001), représentées en bleu foncé ; et 15 avec un FDR < 15% (*fold change* >2 et *p-value* <0.05), représentées en bleu clair (**Figure 40A**).

Parmi ces substrats, nous avons repéré plusieurs protéines appartenant au complexe hautement conservé NuA4/Tip60 (aussi appelé Ep400/Tip60) (**Figure 40B**) (Helmlinger and Tora, 2017). Il s'agit de Dmap1, Ruvbl1 et Trrap, en rouge dans la représentation graphique des protéines les plus différentiellement hypoSUMOylées sous LPS (FDR < 15%) (**Figure 40D**). Les réseaux de protéines obtenus par *String Bioinformatics* montrent que ces substrats sont interconnectés entre eux (**Figure 40C**). Bien que n'apparaissant pas tous significativement et différentiellement exprimés entre les différentes conditions, l'analyse du SUMOylome révèle que de nombreux membres du complexe NuA4/Tip60 sont SUMOylés et que le nombre de sites SUMOylés de ces substrats a tendance à diminuer sous LPS, comme c'est le cas pour Dmap1, Ruvbl1 et Trrap.

NuA4/Tip60 est un complexe protéique qui possède une activité chromatinienne histone acétyl-transférase, ainsi que des activités d'ATPase, d'ADN hélicase et de liaison à l'ADN. Il est notamment impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN double brin et est présenté comme un régulateur important de la stabilité et de l'expression du génome (Jacquet et al.,

2016). Ep400, composant majeur de ce complexe, est associé au dépôt d'H2AZ et d'H3.3 au niveau de promoteurs et d'*enhancers*. Ces deux variants d'histones remplacent les histones canoniques dans certains contextes. Dans une étude de Pradhan *et al.*, le remplacement des histones canoniques par H2AZ et H3.3 sous l'effet d'Ep400 augmente l'expression des gènes concernés (Pradhan *et al.*, 2016). Dans le contexte de la réponse interféron de type I, la présence d'H2AZ agit comme un répresseur des ISGs et H2AZ est perdu sous stimulation IFN-I, tandis que l'incorporation d'H3.3 est liée à leur activation et est augmentée sous stimulation par la voie IFN-I (Au-Yeung and Horvath, 2018; Tamura *et al.*, 2009).

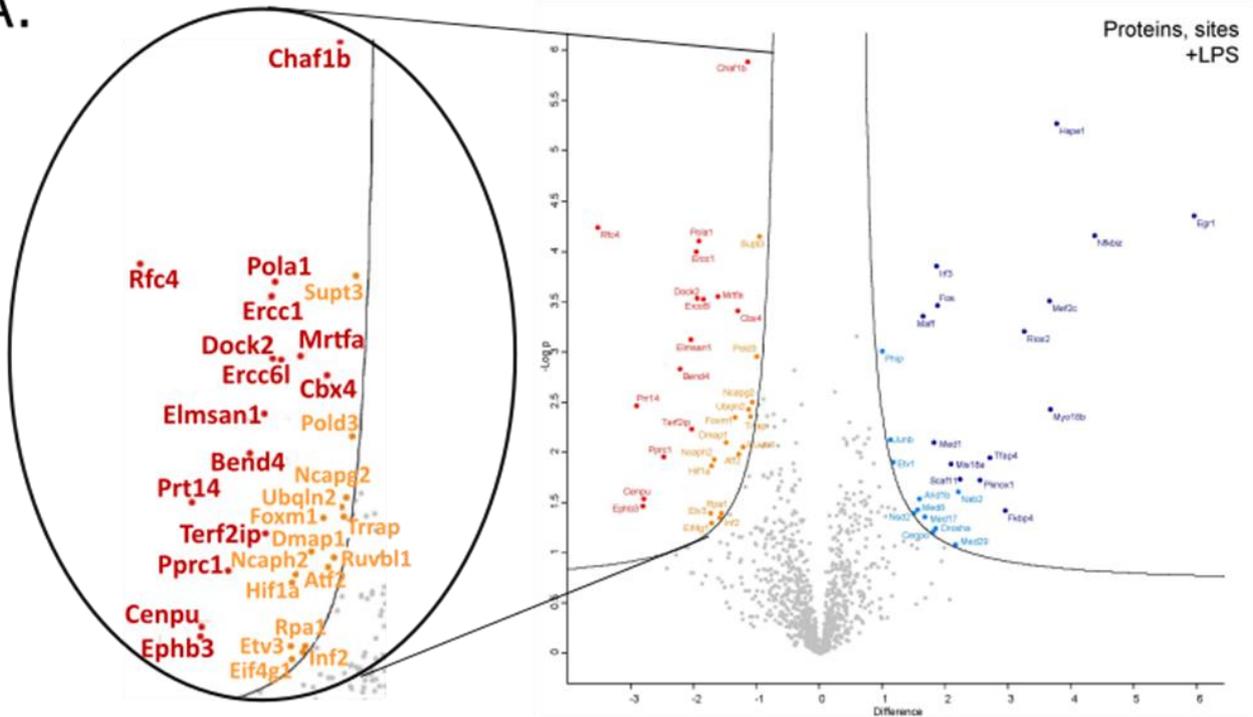
Notre hypothèse est donc que l'engagement du LPS avec le TLR4 entraînerait une hypoSUMOylation des membres du complexe Ep400/Tip60, favorisant ainsi le dépôt de H3.3 mais pas celui d'H2AZ sur les promoteurs et les *enhancers* du gène *Ifnb1* et des ISGs ce qui induirait donc une réponse massive d'interféron de type I.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons commencé par confirmer les données du SUMOylome et valider l'hypoSUMOylation de ces substrats. Bien que Dmap1, Ruvbl1 et Trrap ne fassent pas partie des protéines les plus différenciellement hypoSUMOylées, leur niveau absolu de SUMOylation est élevé. Ainsi, Rubl1 est classé 161^{ème} sans stimulation et 257^{ème} sous stimulation LPS, Dmap1 est 60^{ème} sans stimulation et 98^{ème} sous LPS et Trrap est 43^{ème} dans la condition contrôle et 77^{ème} dans la condition LPS. La valeur absolue du niveau de SUMOylation de ces substrats laisse présager une visualisation directe de la bande SUMOylée par Western-blot direct. Toutefois, les anticorps testés pour Ruvbl1 ne donnaient pas de résultats satisfaisants du fait de nombreuses bandes aspécifiques, et le très haut poids moléculaire de Trrap rend difficile la détection de ses formes SUMOylées par Western-blot (données non-montrées).

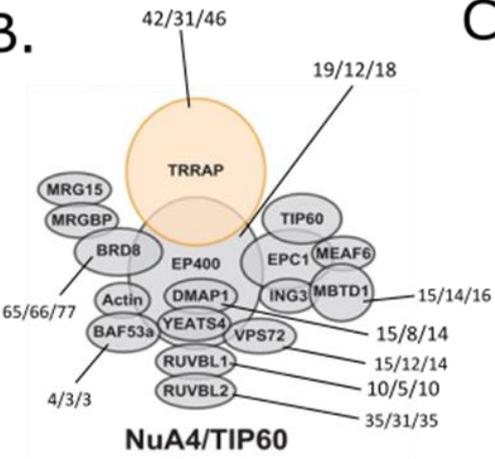
En revanche, la fraction SUMOylée de Dmap1 (flèche blanche) est visible en Western-blot direct et disparaît en présence de ML-794. De plus, la bande SUMOylée semble moins importante dans les cellules soumises à une stimulation LPS, en particulier lors du temps 1h, ce qui vient confirmer les données du SUMOylome (**Figure 40E**).

Nous avons donc montré que Dmap1, membre du complexe Ep400/Tip60 était bien modifié par SUMO-2/3, et que cette SUMOylation diminuait sous stimulation LPS. Nous cherchons donc maintenant à comprendre l'impact de cette hypoSUMOylation sur l'action de ce complexe au niveau de la réponse IFN-I en recherchant l'apparition de H3.3 et la disparition de H2AZ sur les promoteurs des ISGs.

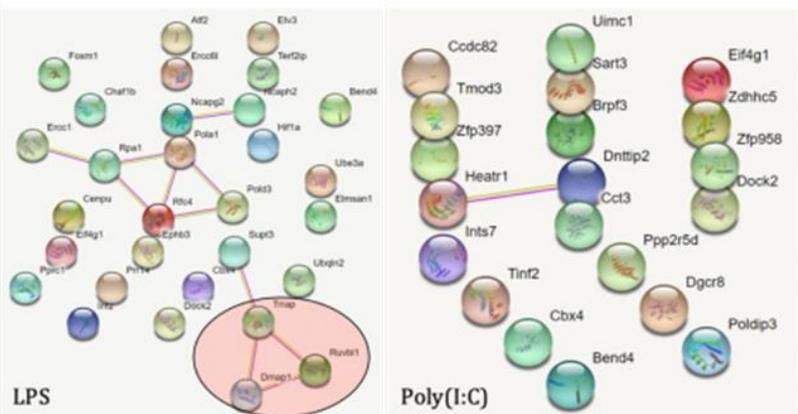
A.



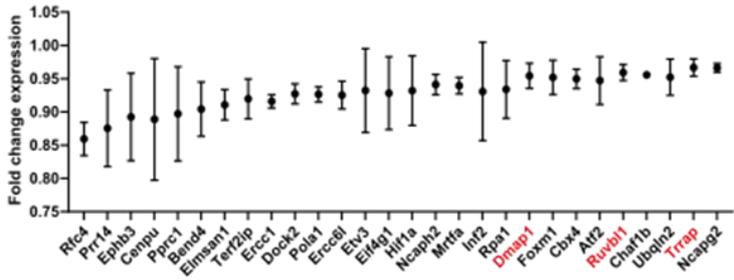
B.



C.



D.



E.

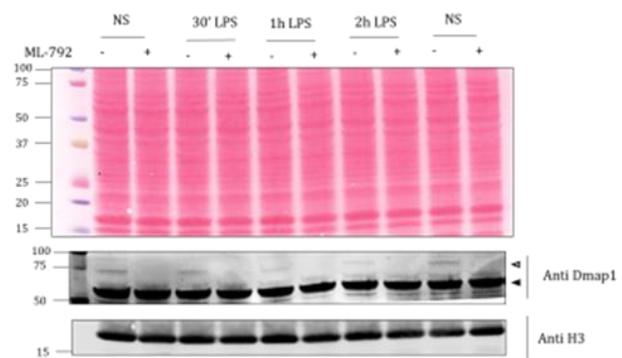


Figure 40 : Substrats différentiellement hypoSUMOylés sous stimulations LPS et poly(I :C).

(A) *Volcano plot* des protéines hypoSUMOylées (en rouge et orange) et hyperSUMOylées (en bleu) lors d'une stimulation par LPS, et zoom sur les protéines différentiellement hypoSUMOylées. La différence représentée sur l'axe x correspond au rapport du niveau de SUMOylation lors de la stimulation par LPS sur le niveau de SUMOylation des cellules contrôles non stimulées. L'axe y correspond au logarithme de la *p-value*. Plus une protéine s'éloigne du centre de l'axe x, et plus elle est différentiellement SUMOylée, plus elle se situe haut au niveau de l'axe y, et plus cette différence est statistiquement significative.

(B) Schéma du complexe NuA4/Tip60 et du nombre de site SUMO comptabilisé pour chacun des membres en conditions non-stimulée, stimulée avec 1h de LPS et 2h de poly(I:C). Adapté de *Helmlinger and Tora, 2017*.

(C) Réseaux de protéines significativement hypoSUMOylées après stimulation par LPS ou poly(I :C). Ces réseaux ont été créés à l'aide du logiciel en ligne *String Bioinformatics*, sur la base du « *textmining* » et « *experimentation* ».

(D) Représentation graphique des protéines les plus différentiellement hypoSUMOylées sous LPS (15% FDR = : *fold change* >2 et *p-value* <0.05). Les protéines en rouge correspondent aux protéines appartenant au complexe NuA4/Tip60.

(E) Western Blot Dmap1 et H3 réalisés dans des RAW 264.7 avec ou sans 24h de traitement au ML-792 en conditions non-stimulée ou sous des durées croissantes de LPS (30 minutes, 1h et 2h). La flèche noire désigne les substrats non-SUMOylés, et la flèche blanche la forme SUMOylée.

F. Impact de l'hypoSUMOylation sur le mécanisme d'action du complexe EP400/TIP60

Afin de comprendre comment SUMO-2/3 module l'action à la chromatine du complexe Ep400/Tip60, nous avons effectué des ChiP-seq H3.3 et H2AZ dans des cellules RAW 264.7 non-stimulées, ou stimulées par du LPS ou du poly(I:C) et traitées ou non avec du ML-792.

Bien que H2AZ et H3.3 soient présents sur la région en -15kb de l'*Ifnb1* (ainsi qu'en -8kb et en -28kb pour H2AZ), les ChiP-seq ne révèlent pas de différences notables entre les différentes conditions au niveau de ce locus (**Figure 41A et 41B**). Il semble donc que le complexe Ep400/Tip60 n'intervient pas directement au niveau du gène *Ifnb1* et qu'un autre

mécanisme mettant en cause SUMO soit impliqué et explique l'induction massive d'IFN- β observée sous hypoSUMOylation.

Cependant, l'analyse des profils chromatiniens d'H2AZ et d'H3.3 révèle des variations intéressantes de ces derniers au niveau de nombreux gènes impliqués dans la réponse interféron de type I et inflammatoire. Comme on l'avait supposé, H2AZ est présent au niveau de nombreux gènes de réponse à l'IFN-I tels que *Isg15* et une légère tendance à la baisse est observable sous stimulation LPS et poly(I:C). En cas d'hypoSUMOylation globale, H2AZ disparaît presque complètement au niveau de ces gènes, et ce même en condition non-stimulée (**Figure 41C**). Au niveau de certains autres ISGs tels que *Mx2*, il ne semble pas y avoir de diminution d'H2AZ sous stimulation, mais l'hypoSUMOylation mène toutefois à une baisse drastique de sa présence au promoteur en condition non-stimulée (**Figure 41D**). C'est également le cas pour certains gènes de la réponse inflammatoire, tels que *Tnfrsf26* et *Tnfrsf22*, où une hypoSUMOylation mène à une disparition totale d'H2AZ avec ou sans stimulation (**Figure 41E**).

H3.3, bien que présent au niveau des promoteurs de nombreux ISGs, ne montre des variations que sur certains d'entre eux. Ainsi, la présence de ce variant d'histone ne varie pas au niveau du gène *Isg15*, ni en cas de stimulation, ni en cas de perte de la voie SUMO, mais il voit sa présence augmenter au niveau du gène *Mx2* lors du traitement par ML-792 (**Figure 41C et 41D**). De même que pour H2AZ, il est également présent au niveau de plusieurs gènes de la réponse inflammatoire, où son recrutement est favorisé par l'hypoSUMOylation (**Figure 41E**).

Lorsqu'on analyse les voies moléculaires associées à la perte des pics H2AZ sous LPS et sous poly(I:C) en absence d'inhibiteur de la SUMOylation, on observe une activation du système immunitaire et de la réponse à des stimuli inflammatoires (**Figure 41F**). En condition hypoSUMOylée non-stimulée, on observe surtout une activation du système immunitaire et de la réponse anti-virale, plus particulièrement de la réponse IFN-I (**Figure 41F**), qui corrèle avec celle décrite en cas de perte de la SUMOylation.

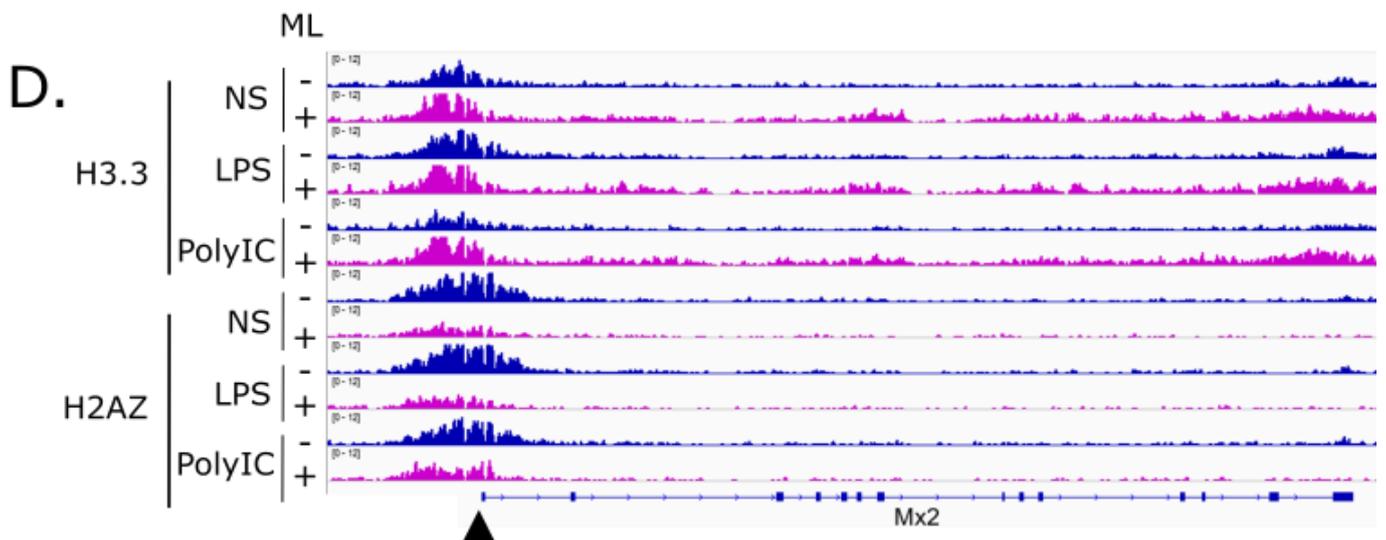
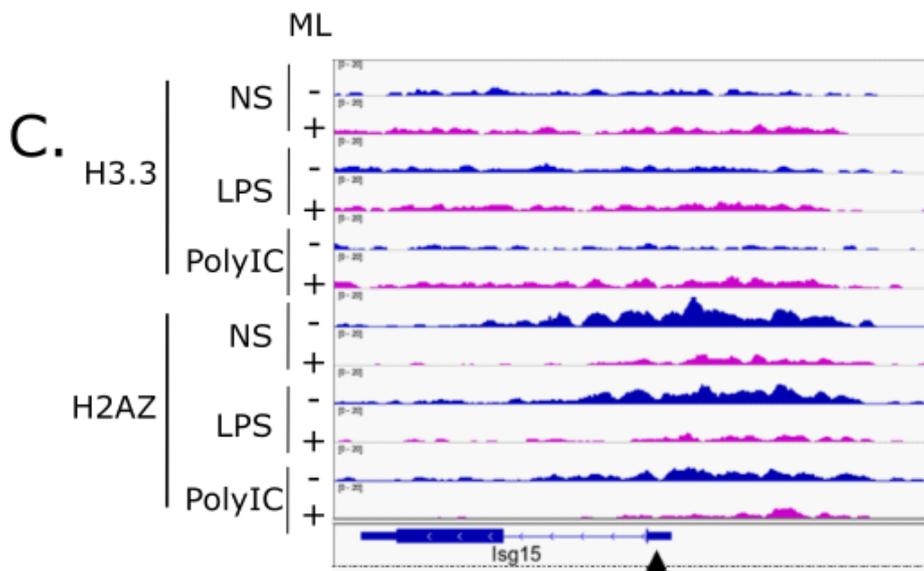
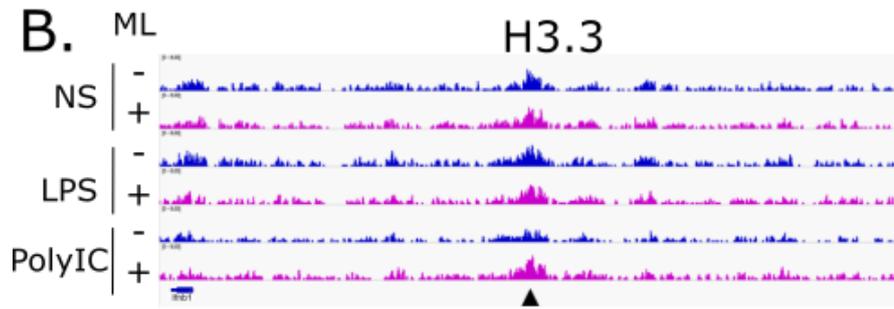
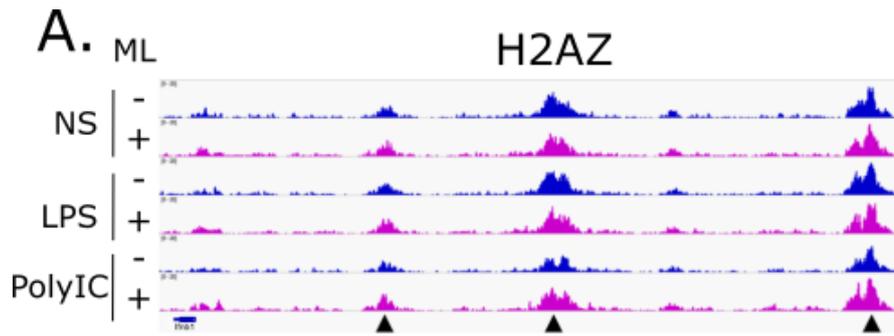
Nous avons donc montré qu'en cas d'hypoSUMOylation, une perte d'H2AZ et un gain de H3.3 sont observés au niveau de certains ISGs et de gènes de la réponse inflammatoire. Ces variations sont associées avec une réponse anti-virale exacerbée, et une activation de la voie interféron de type I. Il semble donc que la SUMOylation du complexe Ep400/Tip60 n'explique pas la régulation directe du gène *Ifnb1* par SUMO, mais qu'elle régule plutôt en aval la réponse IFN-I. Ainsi, sous hypoSUMOylation, le gène *Ifnb1* serait activé par un mécanisme non-identifié, le complexe Ep400/Tip60 viendrait retirer H2AZ et déposer H3.3 au niveau d'ISGs et de gènes de l'inflammation, ce qui entraînerait leur transcription, et permettrait d'amplifier

la réponse IFN-I et inflammatoire et de les faire durer dans le temps. Cela expliquerait le regain d'expression de certains ISGs tels qu'*Ifit2* et le décalage entre le début d'activation d'*Ifnb1* et le début d'activation de certains ISGs tels que *Mx1*.

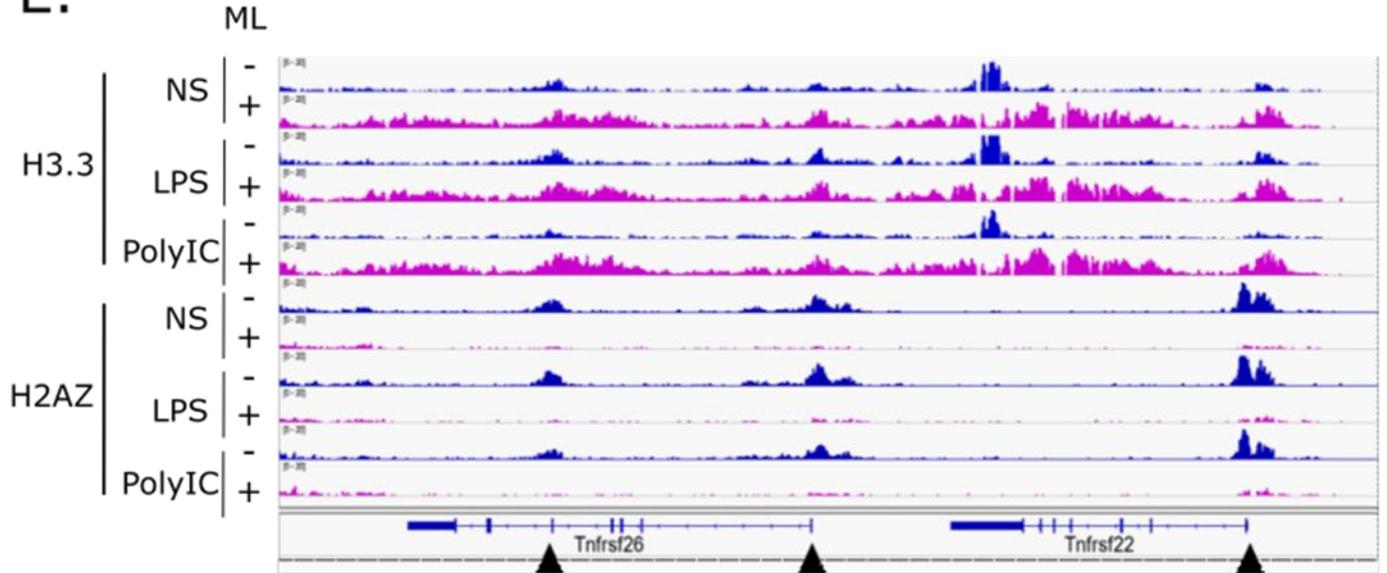
Afin de confirmer que la perte d'H2AZ et le gain d'H3.3 au niveau de ces gènes soient associés à une augmentation de leur transcription, nous avons réalisé un RNA-seq en triplicat dans les mêmes conditions que celles des ChiP. De plus, des expériences de ChiP-seq de membres du complexe Ep400/Tip60 sont en cours afin de vérifier que les variations observées de ces histones soient bien dues à l'action de ce complexe, et que sous hypoSUMOylation, ce complexe est recruté à la chromatine des ISGs et des gènes inflammatoires où le niveau de ces histones varie.

De la même manière que pour Maff, nous allons également induire des mutations au sein des sites SUMO de Dmap1, Ruvb1 et Trrap, trois membres du complexe Tip60, afin d'étudier le rôle spécifique de leur SUMOylation dans la réponse immunitaire innée.

Visuellement, les profils chromatiniens d'H2AZ et d'H3.3 sont similaires après stimulation immunitaire (LPS, Poly(I:C)) et traitement au ML-792. Il semble donc que le stress induit par l'hypoSUMOylation prenne le dessus sur la réponse au stimulus. Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons réaliser des analyses supplémentaires comprenant notamment une recherche d'enrichissement différentiel des voies biologiques sous perte d'H2AZ et gain d'H3.3 en conditions ML-792 + LPS et ML-792 + poly(I:C) ainsi que l'analyse *in silico* des gènes dont les changements d'expression sont corrélés soit avec la présence de ces variants d'histones soit avec les conditions de stimulation immunitaire/SUMOylation.



E.



F.

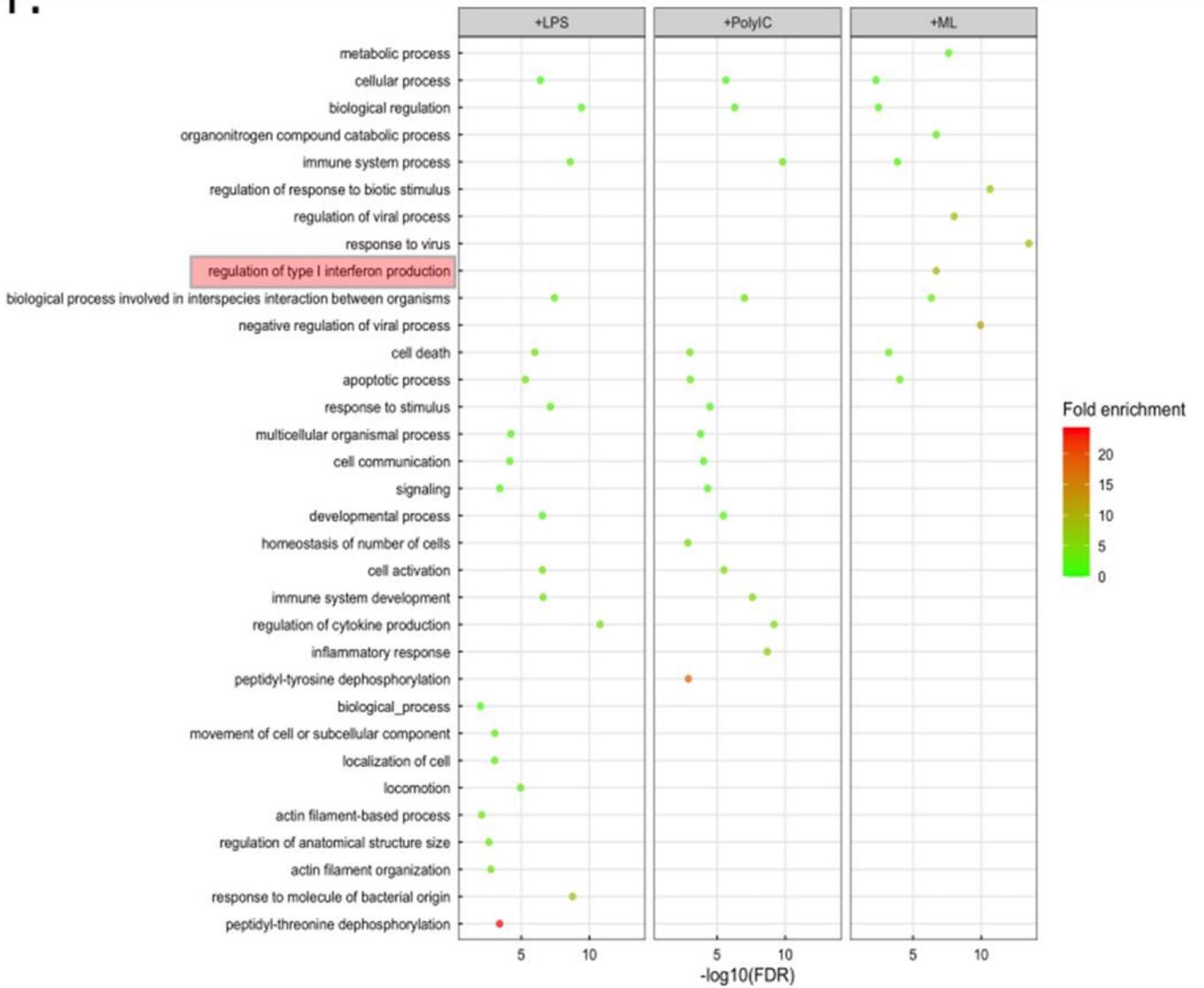


Figure 41 : Impact de l'hypoSUMOylation sur la déposition et le retrait d'H2AZ et d'H3.3 par le complexe EP400/TIP60.

(A-B) ChiP-seq montrant l'enrichissement d'H2AZ (A) et d'H3.3 (b) aux locus -8kb, -15kb et -28 kb du gène *Ifnb1* (flèches noires, le locus -15kb est représenté par l'unique flèche noire de la figure H3.3) en condition non stimulée (NS), stimulée pendant 1h avec du LPS (LPS) ou 2h avec du poly(I:C) (polyIC), dans des cellules Raw 264.7 traitées ou non avec du ML-792. Les données ont été normalisées avec de la chromatine de drosophile pour chaque condition.

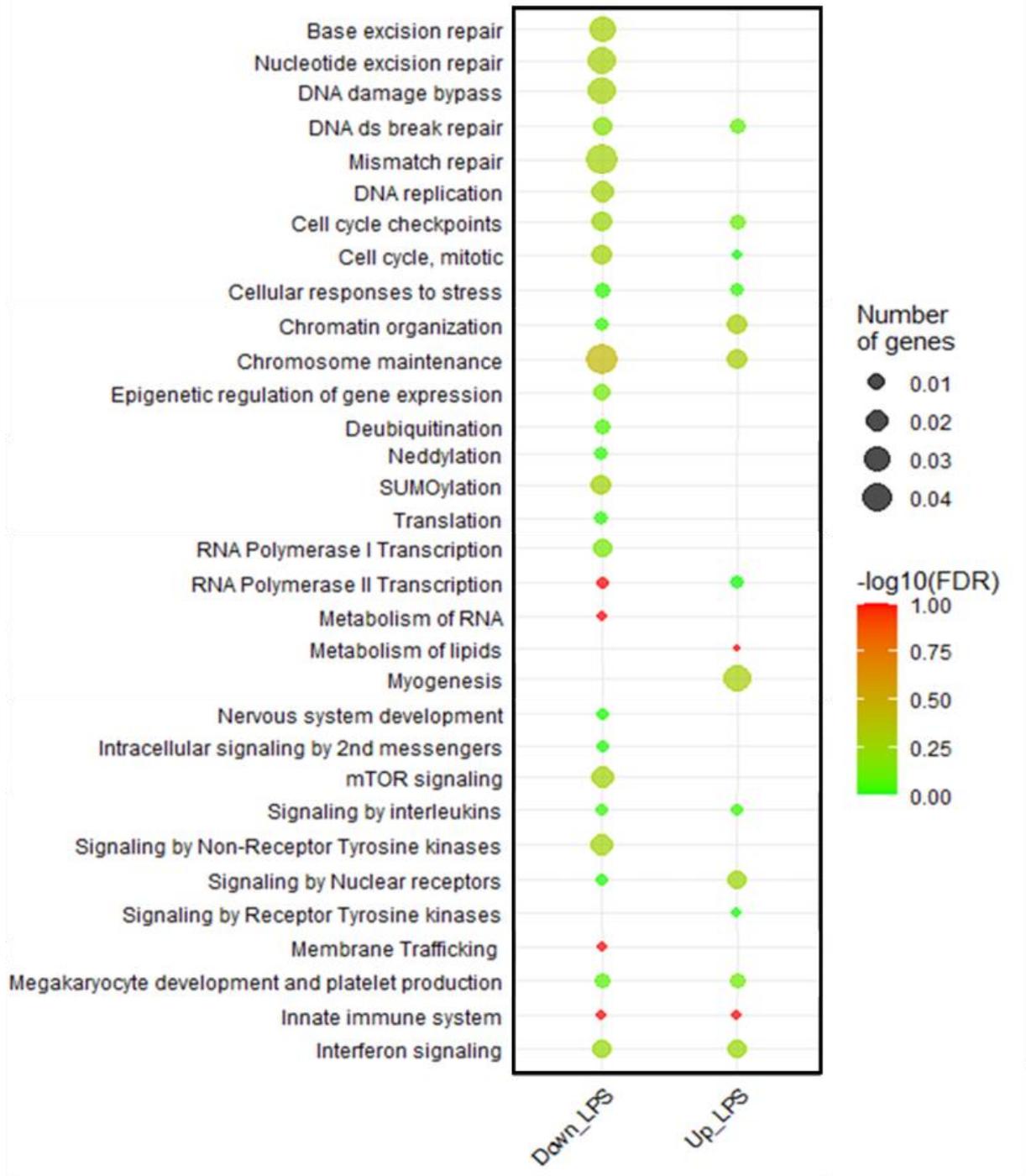
(C-D) ChiP-seq montrant l'enrichissement d'H2AZ et d'H3.3 aux gènes *Isg15* (C), *Mx2* (D) et *Tnfrsf26* et *Tnfrsf22* (e) en condition non stimulée (NS), stimulée pendant 1h avec du LPS (LPS) ou 2h avec du poly(I:C) (polyIC), dans des cellules Raw 264.7 traitées ou non avec du ML-792.

(F) Analyse d'enrichissement des voies biologiques associées à la perte des pics H2AZ en condition LPS et poly(I:C) sans ML-792, et en condition ML-792 non-stimulée.

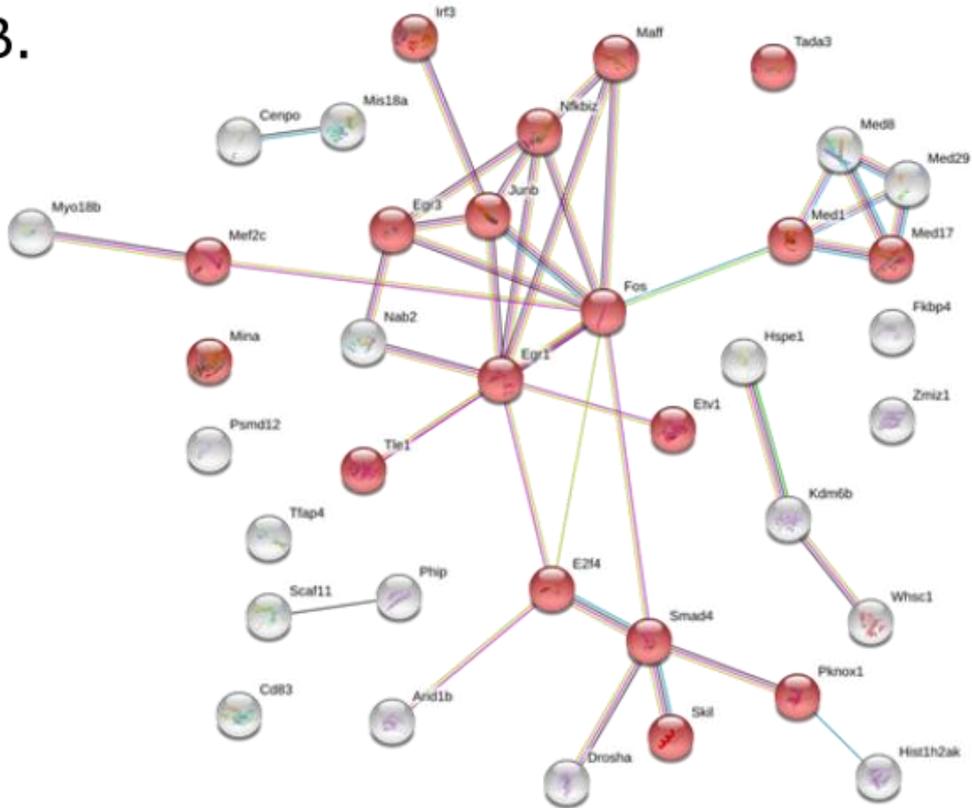
G. Analyse globale des protéines différenciellement SUMOylées

Afin d'obtenir une vision plus globale des fonctions des protéines différenciellement SUMOylées sous LPS, nous avons réalisé des analyses d'enrichissement de voies biologiques à l'aide de la base de données *ShinyGO* (Figure 42A). Les résultats révèlent qu'une proportion statistiquement significative de ces substrats de SUMOylation sont impliqués dans l'immunité innée, la signalisation interféron et cytokinique, et ceci de manière égale entre les cibles hypo- et hyperSUMOylées. De manière générale, les substrats hyperSUMOylés semblent impliqués dans la régulation transcriptionnelle (en rouge sur la figure 42B) tandis que les substrats hypoSUMOylés sont principalement des régulateurs de l'organisation chromatinienne et des facteurs impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (en bleu sur la figure 42C), ce qui est confirmé par les réseaux protéiques réalisés avec *String Bioinformatics* (Figure 42A, 42B, et 42C). S'il est intéressant d'examiner les effets de la SUMOylation individuelle des substrats différenciellement exprimés sous stimulation, du fait notamment de leur nombre peu élevé, il est important de bien fixer le panorama général des substrats SUMOylés. En effet, comme le prouve les réseaux protéiques et les voies moléculaires enrichies, SUMO agit sur des ensembles protéiques partageant certaines fonctions plutôt que sur des protéines à l'activité biologique isolée. Afin d'avoir une image aussi complète que possible du rôle de SUMO dans l'immunité innée, son étude doit donc se faire à plusieurs niveaux de précision.

A.



B.



C.

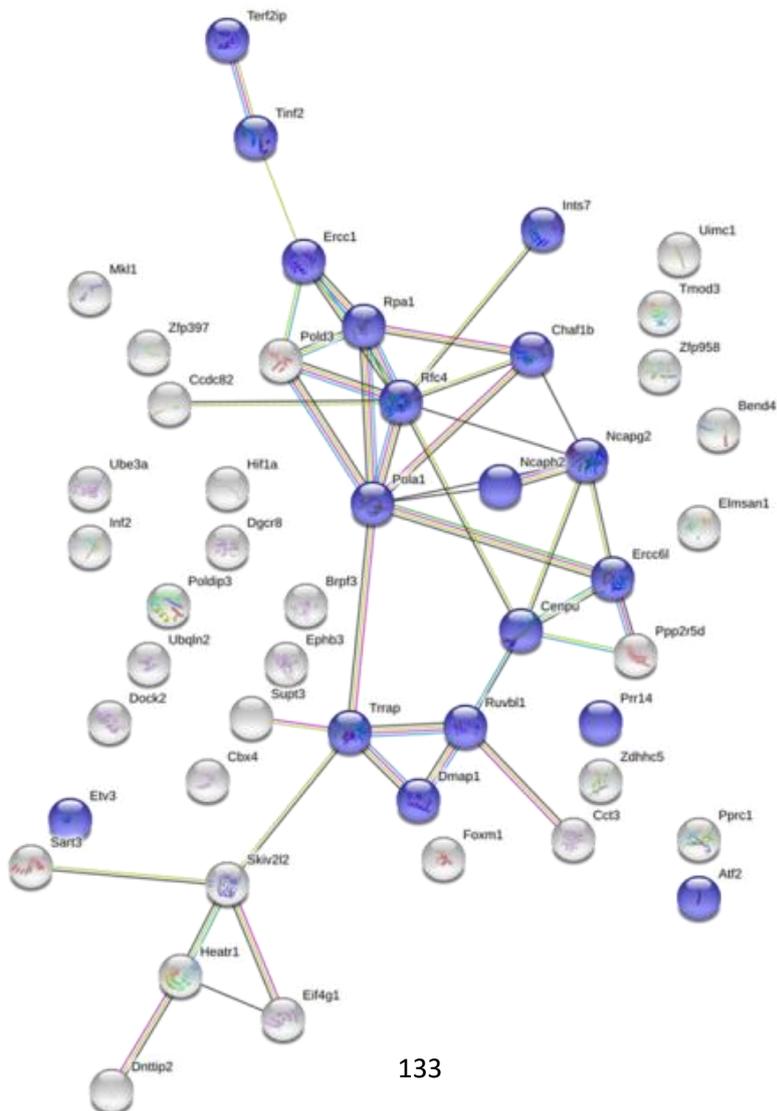


Figure 42 : Analyse ontologique des substrats hypo- et hyperSUMOylés.

(A) Analyse d'enrichissement des voies biologiques associées aux protéines hypo- et hyperSUMOylées sous LPS.

(B) Réseau protéique des protéines hyperSUMOylées sous LPS et poly(I:C). Les protéines représentées en rouge sont impliquées dans la régulation de la transcription.

(C) Réseau protéique des protéines hypoSUMOylées sous LPS et poly(I:C). Les substrats représentés en bleu sont associés à la chromatine.

H. Conclusion

Ce projet a permis de caractériser les premiers SUMOylomes endogènes de macrophages murins en conditions basales ou stimulées par des substances mimétiques de l'action des pathogènes. Ces SUMOylomes nous ont permis d'identifier 3 630 sites SUMO-2/3, cartographiés sur 1 232 protéines dont uniquement 99 sont différentiellement exprimées entre les conditions de notre étude. L'étude des cibles dynamiques de SUMO a révélé plusieurs candidats hyperSUMOylés potentiels pour la régulation de l'*Ifnb1* et une explication à l'amplification des réponses IFN-I et inflammatoire par le complexe Ep400/Tip60, dont les membres sont globalement hypoSUMOylés sous LPS. De plus, cette étude fournit une image globale des processus biologiques impactés par SUMO lors du déclenchement de la réponse immunitaire innée. Enfin, les données de ces SUMOylomes constitueront une ressource exploitable par d'autres équipes dans le domaine de l'immunologie et de la protéomique.

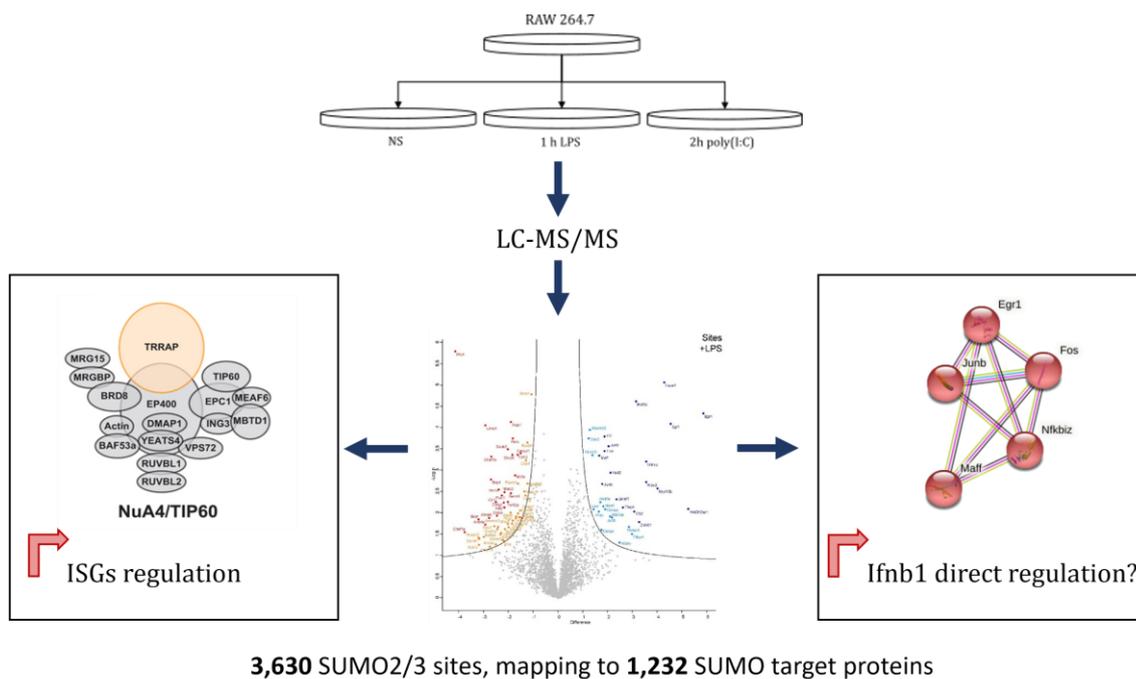


Figure 43 : Schéma récapitulatif de l'étude des SUMOylomes de macrophages murins stimulés ou non.

II. SUMO et immunité anti-tumorale

A. Contexte général de l'étude

Le deuxième aspect du projet visant à comprendre le rôle de la SUMOylation dans l'immunité est plus translationnel et a été réalisé *in vivo*. Il consiste à étudier l'effet de la perte de SUMOylation sur les réponses immunitaires anti-tumorales dans un modèle murin préclinique (collaboration avec Sebastian Amigorena, Institut Curie).

L'immunothérapie constitue une approche nouvelle et prometteuse pour traiter les cancers, cependant le taux de succès chez les patients reste faible. Ainsi, des approches combinées sont recherchées afin d'améliorer le taux de guérison (Zhao et al., 2021). Compte tenu de l'implication de la voie SUMO dans le cancer, l'immunité, la plasticité cellulaire, et de nombreuses voies et processus détournés lors de l'oncogenèse, nous nous sommes intéressés au rôle de SUMO dans l'immunité anti-tumorale. De plus, étant donné le caractère massif de la réponse interféron de type I qu'induit une déficience en la voie SUMO, et l'action synergique de l'IFN-I et des anticorps anti-PD-1, la combinaison d'une immunothérapie classique avec une hypoSUMOylation nous semblait être une potentiellement stratégie efficace (Decque et al., 2016; Liang et al., 2018). Plus précisément, nous cherchons ici à tester si une hypoSUMOylation combinée à une immunothérapie anti-PD-1 pourrait avoir un effet anti-tumoral plus important que le traitement anti-PD-1 seul, puis, si c'est le cas, à en comprendre les mécanismes grâce à des techniques de cytométrie en flux et de scRNA-seq.

B. Une hypoSUMOylation globale couplée à une thérapie anti-PD-1 entraîne un délai de croissance tumorale

Afin d'étudier l'effet anti-tumoral d'une hypoSUMOylation globale, des cellules B16F10-OVA ont été injectées dans le flanc de souris WT et Ubc9^{+/-}. Les B16F10-OVA sont un modèle de mélanome résistant partiellement à l'immunothérapie anti-PD-1 et dans lequel les cellules tumorales expriment l'antigène tumoral ovalbumine. Après établissement des tumeurs, ces souris ont été réparties au hasard en deux groupes, traités ou non par l'anticorps monoclonal anti-PD-1 (**Figure 43A**). Chez les souris WT, le traitement anti-PD-1 induit comme attendu un retard de croissance tumorale observable dans le temps (**Figure 43B et 43C**) mais

non significatif par rapport aux souris non-traitées ($p= 0,0676$) comme le montre l'analyse des volumes tumoraux 20 jours après l'inoculation de la tumeur (**Figure 43D**). Bien que chez les souris $Ubc9^{+/-}$, la croissance de la tumeur ait tendance à être plus importante que chez les $+/+$, l'effet du traitement par anti-PD-1 induit un délai significatif de la croissance tumorale par rapport aux souris $Ubc9^{+/-}$ non-traitées (moyenne du volume tumoral à J20 de 736 mm^3 VS 165 mm^3 , $p<0,0001$) et $Ubc9^{+/+}$ traitées (moyenne du volume tumoral à J20 de 364 mm^3 $p=0,0148$), voir même un rejet total de la tumeur chez certains individus (**Figure 43B, 43C et 43D**). Afin de vérifier l'état d'activation des cellules T cytotoxiques dirigées contre la tumeur, nous avons stimulé *in vitro* les cellules sanguines avec de l'ovalbumine puis réalisé un ELISPOT IFN- γ . Bien que non-significatif du fait du nombre trop faible d'animaux, le niveau d'IFN- γ , un marqueur de la fonctionnalité des cellules T, suit la même tendance que les résultats de croissance tumorale, avec une production cytokinique légèrement accrue chez les souris soumises à une thérapie anti-PD-1 et encore augmentée lorsque le traitement est couplé à l'hypoSUMOylation relative des $Ubc9^{+/-}$ (**Figure 43E**). Nous avons donc montré qu'une perte de 50% de la voie SUMO entraîne, certes, une croissance accrue de la tumeur, mais qu'associée à un traitement anti-PD-1, l'hypoSUMOylation relative engendre un retard significatif de la croissance tumorale, voir un rejet total de la tumeur dans un modèle pourtant réfractaire à l'immunothérapie anti-PD-1 seule.

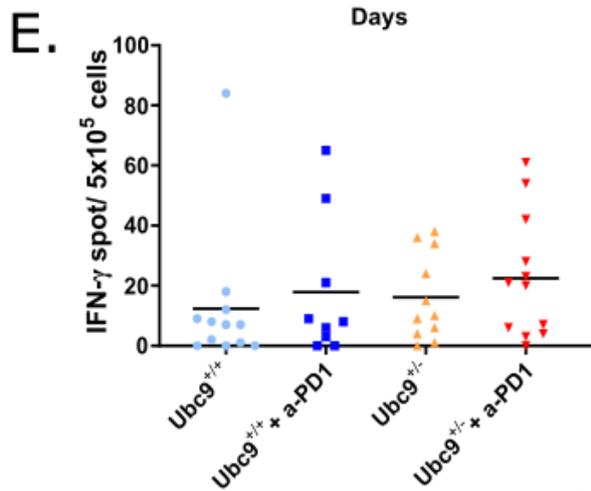
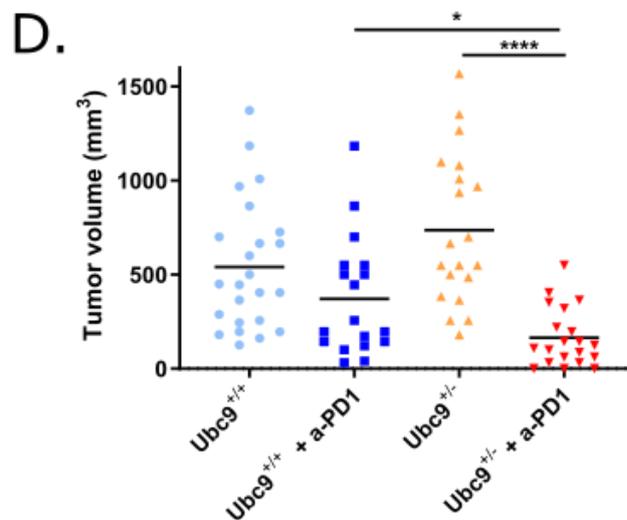
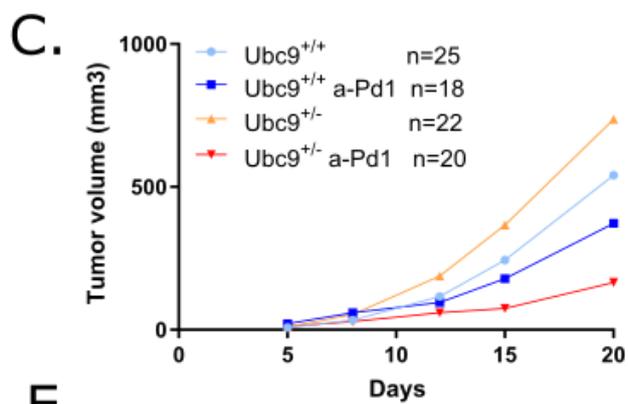
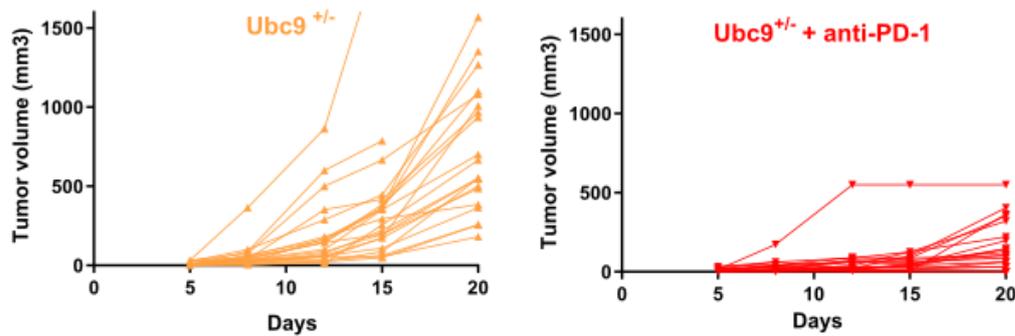
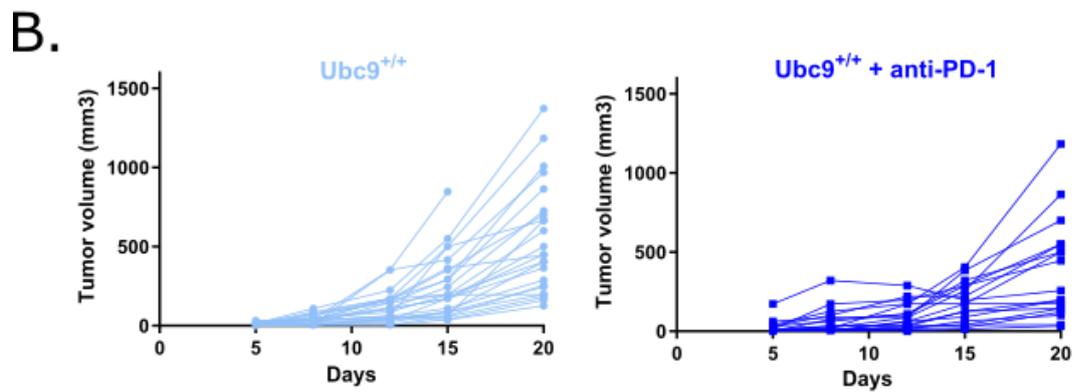
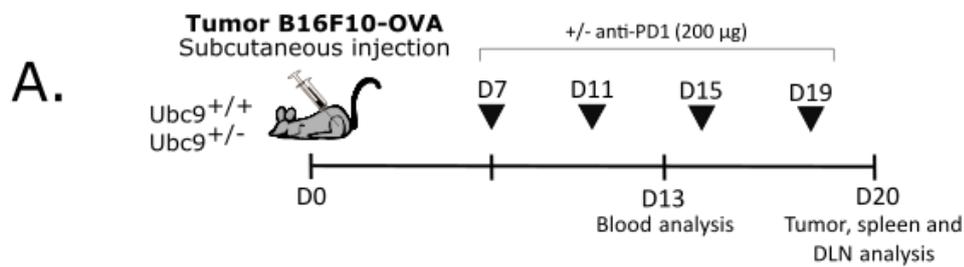


Figure 44 : Induction d'un délai significatif de croissance tumoral lors d'une hypoSUMOylation globale couplée à de l'immunothérapie par anti-PD-1.

(A) Schéma du protocole employé. Les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} sont inoculées avec des cellules de mélanome B16F10-OVA au niveau du flanc et reçoivent ensuite quatre injections d'anticorps anti-PD-1 ou de PBS.

(B) Cinétique de croissance tumorale dans les souris WT ou hétérozygote pour Ubc9 ayant reçu une injection de B16F10-OVA et étant traitées par de l'anticorps anti-PD-1 ou du PBS. Les résultats regroupent trois expériences indépendantes.

(C) Cinétique de croissance tumorale. Les données sont représentées sous forme de moyenne.

(D) Volumes tumoraux en mm³ au jour du sacrifice (jour 20).

(E) La réponse des cellules T cytotoxiques spécifiques à l'OVA a été évaluée par ELISPOT IFN- γ .

Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. **p*<0,05; *****p*<0,0001.

C. Une perte partielle de SUMO dans la lignée myéloïde associée à un traitement anti-PD-1 entraîne un retard de croissance tumorale

Afin de mesurer l'impact de la lignée myéloïde dans l'effet anti-tumoral observé lors du traitement combinant anticorps anti-PD-1 et hypoSUMOylation, nous avons suivi le même protocole expérimental en utilisant cette fois des souris Ubc9^{+/+} LyzM-CRE et Ubc9^{fl/fl} LyzM-CRE (**Figure 44A**). Le promoteur LyzM-CRE étant spécifique à la lignée myéloïde, les allèles d'Ubc9 de ces animaux sont sélectivement perdus dans les populations myéloïdes. Toutefois, nous parlerons ici d'une hypoSUMOylation dans cette lignée et non pas d'une perte totale car la recombinaison n'étant pas optimale, il a précédemment été montré dans le laboratoire que la perte de SUMOylation ne concernait qu'environ 30% des cellules (donnée non-montrée). Comme attendu après un traitement avec anti-PD-1, chez les animaux WT un retard de croissance tumorale est observable mais non significatif (**Figure 44B, 44C et 44D**). Chez les souris Ubc9^{fl/fl}, le traitement anti-PD-1 induit un délai significatif de la croissance tumorale par rapport aux souris Ubc9^{fl/fl} LyzM-CRE non traitées (moyenne du volume tumoral à J20 de 280 mm³ VS 590 mm³, *p*= 0,0227) et suivant la même tendance par rapport aux souris Ubc9^{+/+} LyzM-CRE traitées (moyenne du volume tumoral à J20 de 425 mm³) (**Figure 44B, 44C et 44D**). De façon notable, le volume tumoral moyen des souris Ubc9^{fl/fl} n'est pas augmenté par rapport aux Ubc9^{+/+} (590 mm³ VS 841,5 mm³, *p*= 0,8293) dans ces expériences. Toutefois, étant

donné le nombre inférieur d'individus impliqués dans ces expériences (n=6-7) par rapport à celles concernant les hétérozygotes pour Ubc9 (n=18-25), il est possible que les résultats évoluent avec l'augmentation de la cohorte d'animaux. Ainsi, la tendance vers un retard tumoral observé entre les Ubc9^{+/+} et Ubc9^{fl/fl} LyzM-CRE pourrait devenir significative, et la moyenne des volumes tumoraux entre les deux groupes non-traités pourrait évoluer. Un ELISPOT IFN- γ a également été réalisé et dévoile une production cytokinique accrue chez les souris Ubc9^{fl/fl} LyzM-CRE soumises à une thérapie anti-PD-1 par rapport aux autres groupes, ce qui témoigne de la communication cellulaire entre les populations lymphoïdes et myéloïdes (**Figure 44E**). Il semble donc qu'une perte partielle de la voie SUMO dans la lignée myéloïde associée à un traitement anti-PD-1 entraîne un délai de la croissance tumorale et une réactivité accrue de la population lymphocytaire cytotoxique contre la tumeur. Ces observations suggèrent que le rôle anti-tumoral de l'hypoSUMOylation implique, du moins en partie, les populations myéloïdes.

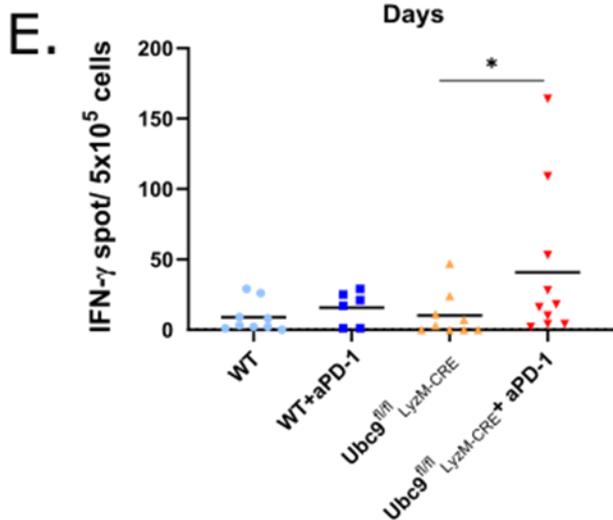
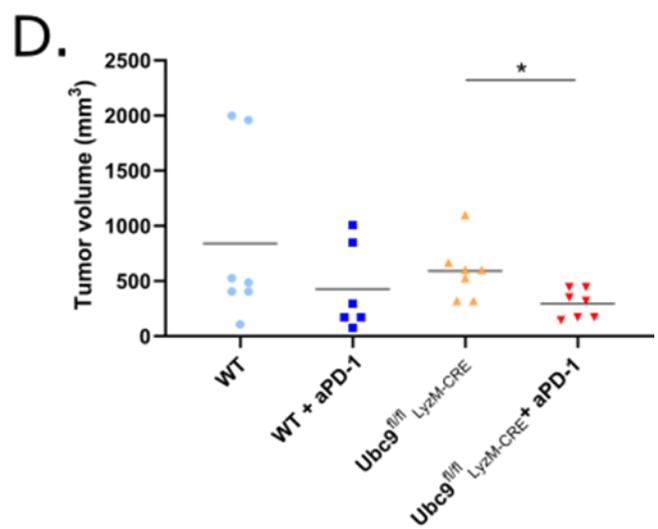
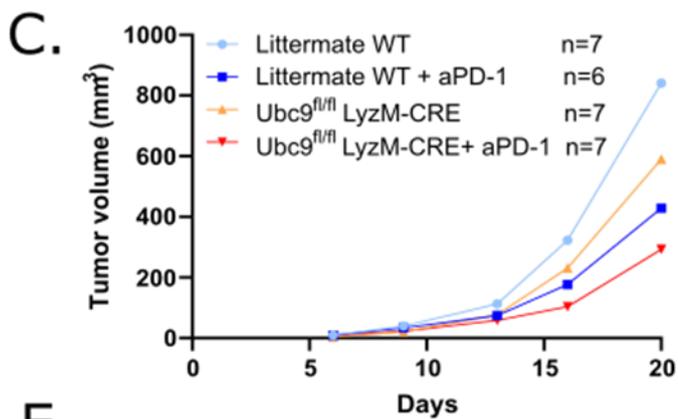
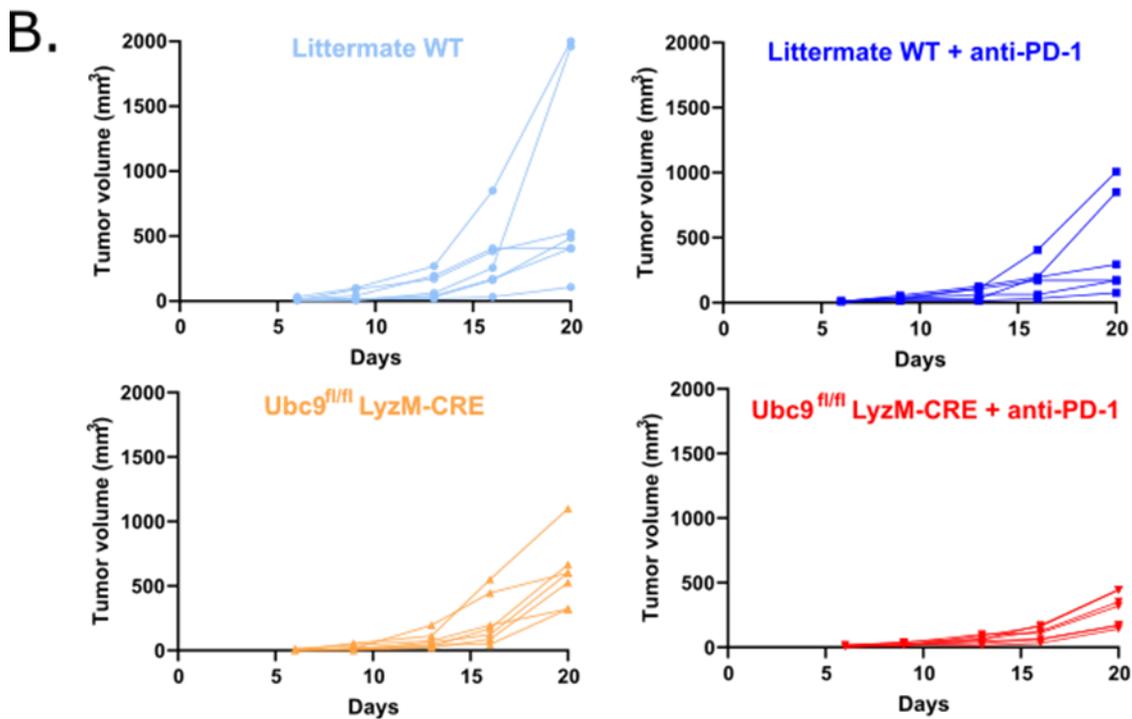
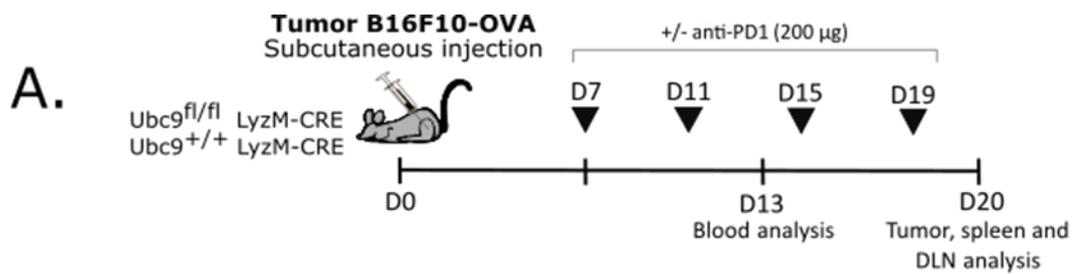


Figure 45 : Induction d'un délai de croissance tumorale lors d'une hypoSUMOylation dans la lignée myéloïde couplée à de l'immunothérapie par anti-PD-1.

(A) Schéma du protocole employé. Les souris $Ubc9^{+/-}$ LyzM-CRE et $Ubc9^{fl/fl}$ LyzM-CRE sont inoculées avec des cellules de mélanome B16F10-OVA au niveau du flanc et reçoivent ensuite quatre injections d'anticorps anti-PD-1 ou de PBS.

(B) Cinétique de croissance tumorale dans les souris WT ou déficientes pour Ubc9 dans la lignée myéloïde ayant reçu une injection de B16F10-OVA et étant traitées par de l'anticorps anti-PD-1 ou du PBS. Les résultats regroupent deux expériences indépendantes.

(C) Cinétique de croissance tumorale. Les données sont représentées sous forme de moyenne.

(D) Volumes tumoraux en mm^3 au jour du sacrifice (jour 20).

(E) La réponse des cellules T cytotoxiques spécifiques à l'OVA a été évaluée par ELISPOT IFN- γ .

Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

D. Une hypoSUMOylation globale associée à un traitement anti-PD-1 modifie les proportions de populations immunitaires.

Afin d'étudier plus en détail les mécanismes associés au délai de croissance tumorale observé chez les souris hétérozygotes pour Ubc9 traitées par anti-PD-1, nous avons mis un point une stratégie de FACS permettant de caractériser les principales populations lymphoïdes et myéloïdes (**Figure Sup 2**). 20 jours après l'inoculation de la tumeur dans les différents groupes de souris, nous avons dissocié les cellules provenant de la tumeur, du ganglion lymphatique drainant la tumeur et de la rate et nous les avons soumis à cette stratégie de cytométrie de flux.

Conformément aux observations précédentes, la proportion de cellules immunitaires infiltrant la tumeur (correspondant aux cellules $CD45.2^+$) est significativement inférieure chez les $Ubc9^{+/-}$ comparé aux WT tandis que la proportion de cellules $CD45.2^+$ est quatre fois plus élevée chez les souris $Ubc9^{+/-}$ traitées par rapport aux $Ubc9^{+/+}$ traitées ($p = 0,0148$), et dix fois plus élevée par rapport aux $Ubc9^{+/-}$ non-traitées (médiane $Ubc9^{+/-} = 1,91$ VS médiane $Ubc9^{+/-} + \text{anti-PD-1} = 19,5$; $p < 0,0001$) (**Figure 45A et 45B**). Ainsi, le retard de croissance tumorale observé chez les souris hypoSUMOylées traitées est corrélé à une infiltration plus importante de cellules immunitaires par rapport aux autres groupes, tandis que la croissance tumorale accrue chez les souris $Ubc9^{+/-}$ par rapport aux $Ubc9^{+/+}$ est associée avec une proportion diminuée de cellules immunitaires infiltrant la tumeur. Par ailleurs, les proportions de cellules immunitaires totales sont les mêmes entre les différents groupes aussi bien au niveau du ganglion lymphatique drainant la tumeur que de la rate, ce qui semble indiquer que le

mécanisme mis en jeu se situe au niveau de la tumeur avec probablement une prolifération accrue et/ou un meilleur recrutement de ces cellules au niveau du site tumoral (**Figure 45C et 45D**).

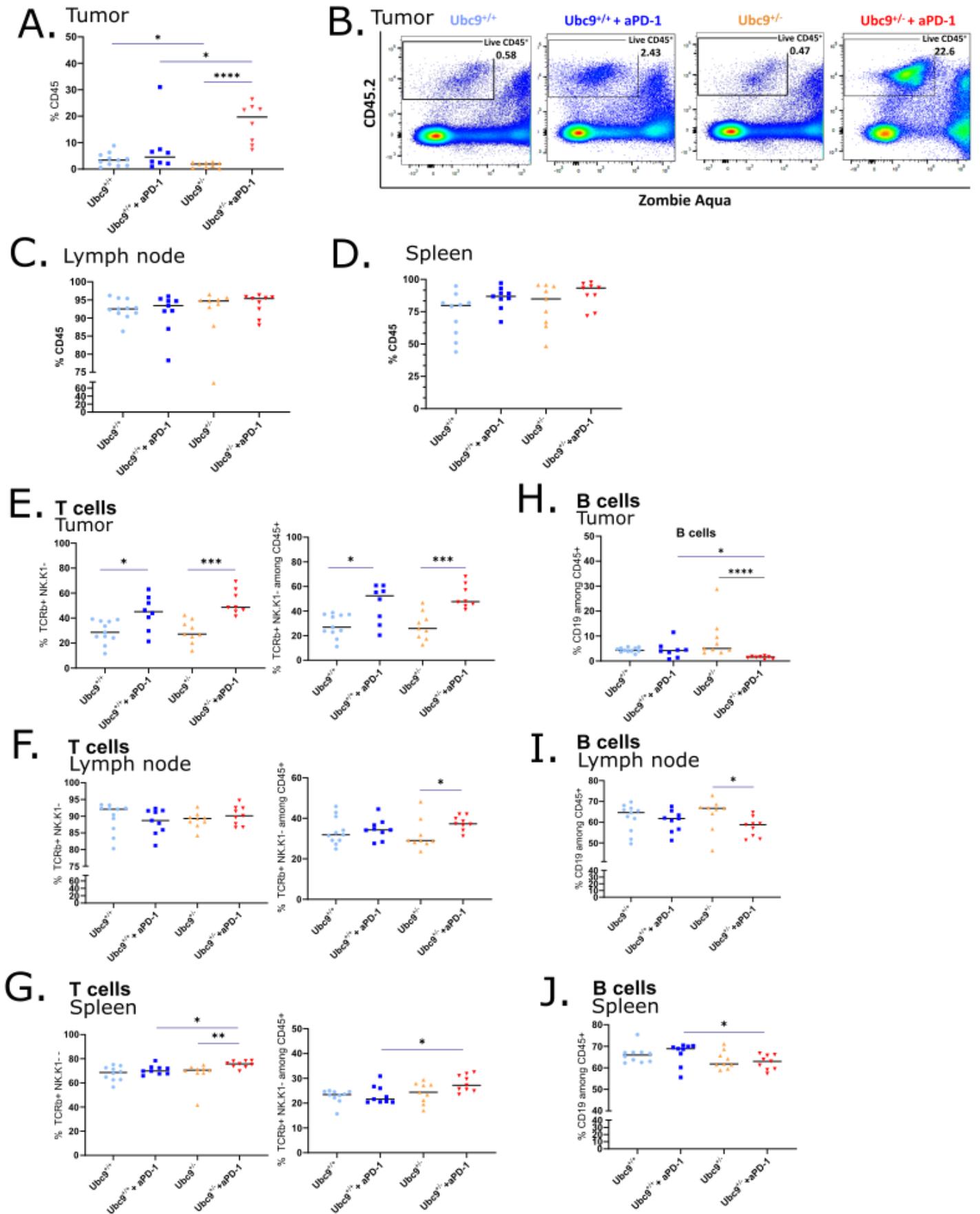
Parmi ces cellules immunitaires, on observe une augmentation significative de la proportion des cellules T (TCRb⁺NK1.1⁻) dans les souris Ubc9^{+/-} traitées par anti-PD-1 par rapport aux non-traitées (p=0,0121) (**Figure 45E et 45L**). Cette augmentation est encore plus significative chez les Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux Ubc9^{+/-} non-traitées (p= 0,0002) bien que les proportions entre les deux groupes traités soient les mêmes (Ubc9^{+/+} traitées =45% et Ubc9^{+/-} traitées =48,5%) (**Figure 45E**). Toutefois, une augmentation significative des cellules T dans le ganglion n'est observable qu'entre les souris hétérozygotes traitées ou non, et se retrouve aussi dans la rate où la différence entre les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées devient elle-aussi significative (**Figure 45F et 45G**). Ces données laissent supposer que, par rapport aux autres groupes, les souris Ubc9^{+/-} traitées avec de l'anti-PD-1 ont une production plus importante de cellules T et/ou que ces cellules migrent plus massivement vers la tumeur. A l'inverse, le niveau de cellules B (CD19⁺) est cinq fois moins élevé chez les Ubc9^{+/-} traités par rapport aux Ubc9^{+/+} traités (p= 0,0404) et aux groupes non-traités (p<0,0001) (**Figure 45H**). Cette baisse est également observée dans le ganglion et la rate. Il semble donc que, lors de l'hématopoïèse, la production de cellules B chez les Ubc9^{+/-} recevant de l'anti-PD-1 soit diminuée en faveur d'une intensification de la production de cellules T.

Le niveau de cellules *natural killer* T (NK1.1⁺ TCRb⁺) est également plus important chez les Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 comparé aux Ubc9^{+/-} (3,7% VS 2%, p= 0,0206) et aux Ubc9^{+/+} + anti-PD-1 (3,7% VS 2%, ns). Les proportions de NKT sont en revanche similaire entre les WT traitées ou non (**Figure 45K et 45L**) ainsi qu'entre les quatre groupes au niveau du ganglion comme de la rate (**Figure 45M et 45N**).

Parmi les populations lymphoïdes, le niveau de cellules *natural killer* n'a pas été modifié de manière critique par le traitement anti-PD-1 chez les souris WT ou Ubc9^{+/-} (**Figure Sup 3A-C**). De même chez les populations myéloïdes (monocytes, neutrophiles, éosinophiles, cDC1, cDC2, macrophages, moDCs), les modifications sont subtiles et semblent indiquer une légère diminution globale de l'ensemble de ces populations chez les Ubc9^{+/-} traités, excepté pour les cDC2 qui connaissent une évolution inverse (**Figure Sup 3D-F, 4, 5 et 6**).

En conclusion, le délai de croissance tumorale rapporté chez les Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 semble être majoritairement dû à une infiltration plus importante de cellules immunitaires au sein de la tumeur, en particulier des populations lymphoïdes T et NKT. Toutefois, la population myéloïde apparaît également cruciale étant donné qu'une perte partielle de la voie SUMO dans

cette lignée induit un retard de croissance tumorale quand les cellules sont traitées par anti-PD-1. Bien que les changements observables en FACS au niveau de ces populations soient subtils et globalement non-significatifs, il est à noter que la proportion de certaines populations non-caractérisées par notre panel sont démontrées comme augmentées par le scRNA-seq des souris Ubc9^{+/-} traitées, telles que les pDCs (donnée non montrée). De plus, la proportion de cellules CD45.2⁺ étant beaucoup plus importante chez les Ubc9^{+/-} + anti-PD-1, et les populations décrites étant normalisées par rapport aux CD45.2⁺ ou à la population parentale dont elles sont issues, il est probable que le nombre réel de cellules myéloïdes infiltrant la tumeur des Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 est en réalité supérieur aux autres groupes. Il serait nécessaire d'avoir le dénombrement de ces populations afin de pouvoir réellement conclure à ce sujet.



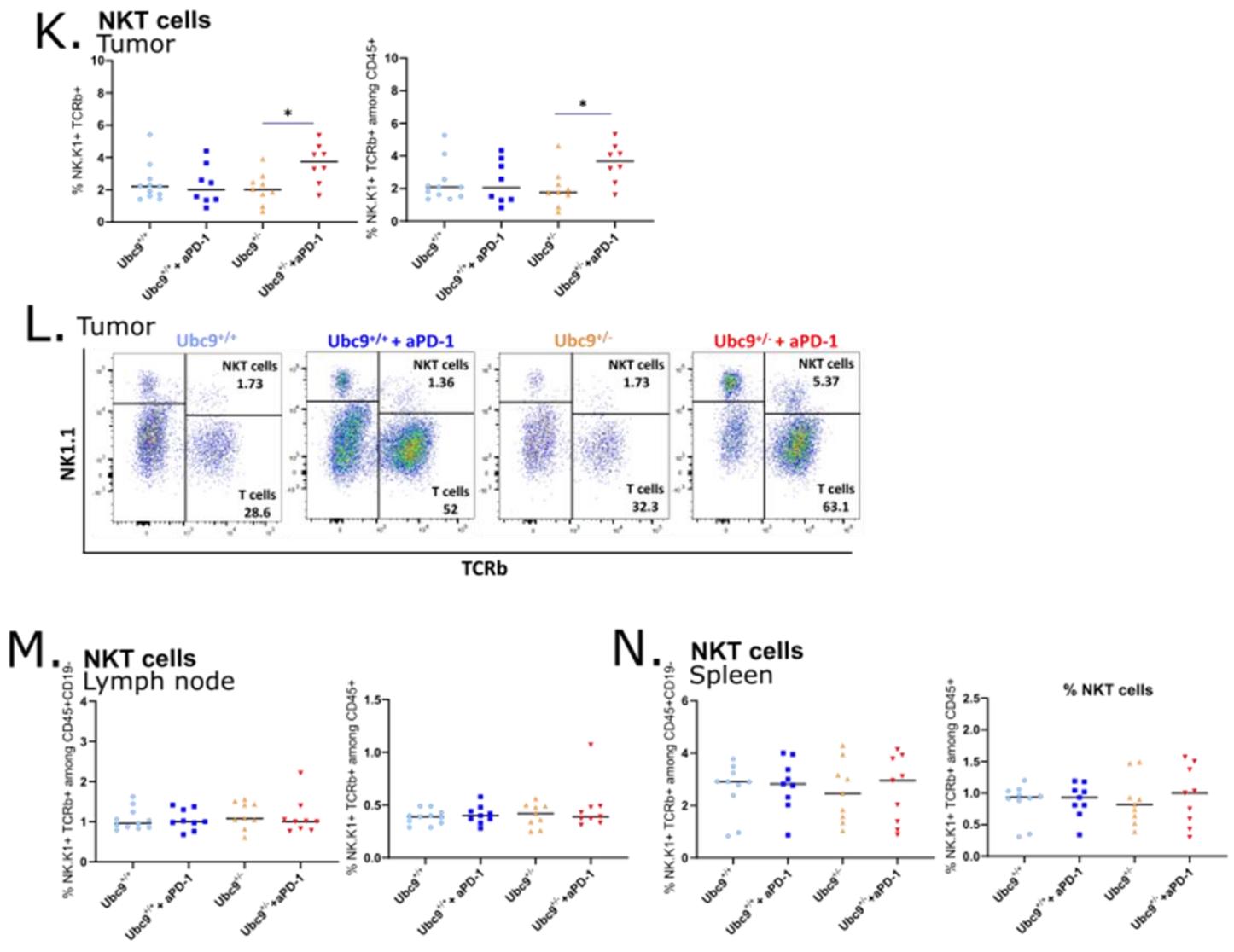


Figure 46 : Modification des proportions de populations immunitaires induite par une hypoSUMOylation globale couplée au traitement anti-PD-1.

(A) Fréquence (%) des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales des tumeurs B16F10-OVA.

(B) *Dot plots* représentatifs de la fréquence des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales des tumeurs B16F10-OVA.

(C-D) Fréquence des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales du ganglion lymphatique drainant la tumeur (C) et de la rate (D).

(E-G) Fréquence des cellules TCRb⁺NK1.1⁺ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des TCRb⁺NK1.1⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA (e), du ganglion lymphatique drainant la tumeur (F) et de la rate (G).

(H-J) Fréquence des cellules CD19⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA (H), du ganglion lymphatique drainant la tumeur (I) et de la rate (J).

(K) Fréquence des cellules NK1.1⁺ TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des NK1.1⁺ TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA.

(L) *Dot plots* représentatifs de la fréquence des cellules NK1.1⁺ TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ des tumeurs B16F10-OVA.

(M-N) Fréquence des cellules NK1.1⁺ TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des NK1.1⁺ TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺ du ganglion lymphatique drainant la tumeur (M) et de la rate (N).

Les résultats regroupent trois expériences indépendantes. Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. **p*<0,05 ; ***p*<0,01 ; ****p*<0,001 ; *****p*<0,0001.

E. La voie interféron de type I semble impliquée dans la réponse anti-tumorale induite par l'hypoSUMOylation couplée à la thérapie anti-PD-1

Afin de vérifier l'implication de la voie interféron de type I dans la réponse immunitaire anti-tumorale observée sous hypoSUMOylation, nous avons répété les expériences précédentes de croissance tumorale à l'aide de modèles murins présentant une délétion totale du récepteur aux interférons de type I, IFNAR, croisés avec nos souris hétérozygotes pour Ubc9 (**Figure 46A**). Comme rapporté dans la littérature, le développement tumoral chez les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} suivait une progression plus rapide que chez les WT (1418 mm³ VS 540,5 mm³ après 20J, **Figure 43B et 46B**) (Katlinski et al., 2017; Lu et al., 2019). Chez les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+}, le traitement anti-PD-1 induit un léger retard de croissance tumorale par rapport aux souris non-traitées (1418 mm³ VS 1100 mm³) comme le montre l'analyse des volumes tumoraux 20 jours après l'inoculation de la tumeur (**Figure 46B, 46C et 46D**). Tout comme les Ubc9^{+/+}, les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} voient leur croissance tumorale progresser plus rapidement par rapport aux IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+}, bien que cela ne soit pas significatif (1798 mm³ VS 1418 mm³, *p*= 0,6304). Toutefois, le traitement par anti-PD-1 des Ubc9^{+/-} n'induit plus d'effet anti-tumoral significatif par rapport aux souris Ubc9^{+/-} non-traitées mais une tendance similaire à celle des IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} traitées VS non-traitées (moyenne du volume tumoral à J20 de 1798 mm³ VS 1412 mm³, *p*=0,4407) (**Figure 46B, 46C et 46D**). De plus, le volume tumoral à J20 des IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} est le même que celui des IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+}, voir même supérieur (1412 mm³ VS 1100 mm³). Il semble donc que la perte du récepteur IFNAR ait abolie l'effet anti-tumoral observé lors de la combinaison entre une hypoSUMOylation et un traitement anti-PD-1.

Toutefois, ces expériences nécessitent d'être répétées afin d'augmenter la cohorte d'animaux, et d'explorer les mécanismes sous-jacents l'effet observé.

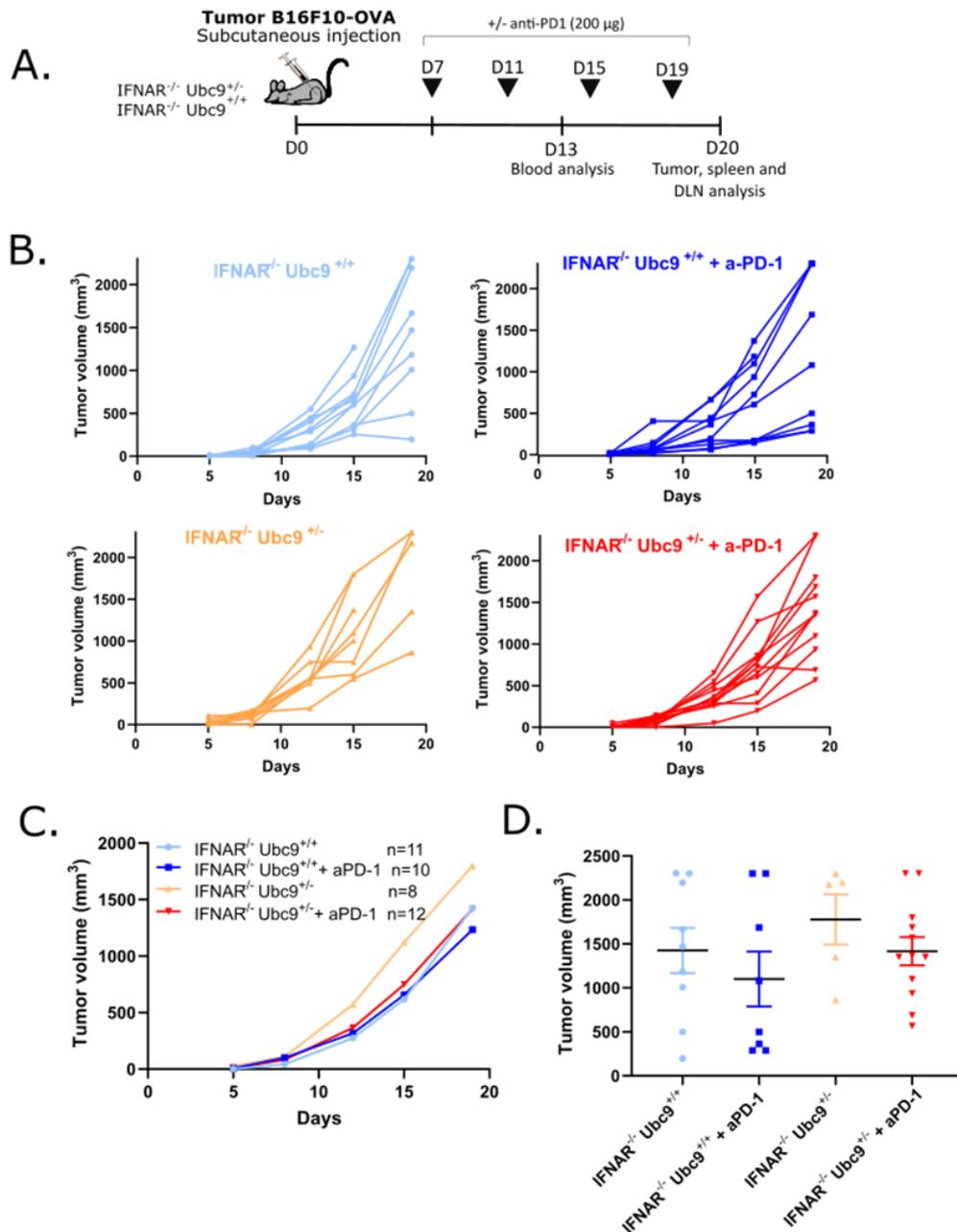


Figure 47 : Implication de la voie interféron de type I dans le délai de croissance tumorale induit par l'hypoSUMOylation + anti-PD-1.

(A) Schéma du protocole employé. Les souris $IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+}$ et $IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-}$ sont inoculées avec des cellules de mélanome B16F10-OVA au niveau du flanc et reçoivent ensuite quatre injections d'anticorps anti-PD-1 ou de PBS.

(B) Cinétique de croissance tumorale dans IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} et IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} ayant reçu une injection de B16F10-OVA et traitées par de l'anticorps anti-PD-1 ou du PBS. Les résultats regroupent deux expériences indépendantes.

(C) Cinétique de croissance tumorale. Les données sont représentées sous forme de moyenne.

(D) Volumes tumoraux en mm³ au jour du sacrifice (jour 20).

La stratégie de FACS précédemment présentée a été appliquée aux souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} ou IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} traitées ou non afin de mieux comprendre l'implication de la voie interféron de type I dans la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par l'hypoSUMOylation. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, elle nécessite d'être répétée, et les tendances présentées dans ce manuscrit sont susceptibles d'évoluer.

La proportion de cellules immunitaires infiltrant la tumeur (correspondant aux cellules CD45.2⁺) a tendance à augmenter chez les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} traitées (3,3% VS 1,1 %, p= 0,2667), ainsi que par rapport aux IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} non-traitées (0.30 %, p= 0,2000) (**Figure 47A et 47B**). Les proportions de cellules immunitaires totales sont les mêmes entre les différents groupes au niveau du ganglion lymphatique drainant la tumeur et de la rate, excepté pour les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} qui présente moins de cellules immunitaires dans la rate (**Figure 47C et 47D**). Malgré l'absence de phénotype anti-tumoral macroscopique chez ces souris lors d'une hypoSUMOylation couplée à de l'anti-PD-1, on observe toutefois une recrudescence de cellules immunitaires. Cependant, il est important de souligner que cette proportion reste faible par rapport à celle des souris Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 (3,3% VS 19.5 %), ce qui pourrait expliquer qu'elle ne soit pas suffisante pour déclencher une réponse anti-tumorale efficace. Cette tendance pourrait être due soit à un effet seulement partiel de la voie IFN-I dans la réponse anti-tumorale observée, soit au faible nombre d'animaux présents dans cette étude.

Parmi ces cellules immunitaires, la proportion de cellules T (TCRb⁺NK1.1⁻) est également à la hausse dans les souris Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux Ubc9^{+/-} non-traitées (42,6% VS 24,5%, p=0,2000) et au Ubc9^{+/+} + anti-PD-1 (42,6% VS 17.2%, p=0,2667) (**Figure 47E**), tandis que ces valeurs sont similaires entre les différents groupes dans le ganglion et la rate (données non montrées). Parmi les cellules T infiltrant la tumeur, on observe une augmentation de la proportion des cellules CD8 (CD8⁺ CD4⁻) et une baisse des CD4 (CD4⁺ CD8⁻) chez les souris Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 comparé aux Ubc9^{+/-} et aux Ubc9^{+/+} + anti-PD-1 (**Figure 47F, 47G et 47H**). En revanche, lorsque l'on normalise le pourcentage de cellules CD4 par rapport au CD45.2⁺ chez les Ubc9^{+/-} traitées, celui-ci est plus élevé que dans les autres

groupes. De même que chez les souris hétérozygotes, le niveau de cellules B (CD19⁺) est environ trois fois moins élevé chez les Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux Ubc9^{+/+} traitées et presque dix fois moins élevé par rapport aux Ubc9^{+/-} (**Figure 47I**). Cette baisse n'est pas observée dans le ganglion et la rate (données non montrées).

Parmi les populations lymphoïdes, les niveaux de cellules NK et NKT n'ont pas subi de changement drastique par le traitement anti-PD-1 chez les souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} ou IFNAR^{-/-}Ubc9^{+/-} (**Figures Sup 7A et 7B**). Chez les populations myéloïdes, le faible nombre d'animaux et les modifications moins notables ne permettent ni de conclure, ni de donner une tendance (**Figures Sup 7C-I**)

Il semble donc que la voie IFN-I joue un rôle important dans la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par la combinaison d'une hypoSUMOylation et du traitement anti-PD-1. Bien que les souris IFNAR^{-/-} voient le nombre de cellules immunitaires infiltrants la tumeur drastiquement réduire, il semble qu'il y en ait plus chez les IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-}, en particulier la branche des cellules T. Ces résultats nécessitent d'être répétés, mais permettent de mettre en lumière quelques éléments de réponse sur le fonctionnement de la régulation de la réponse IFN-I anti-tumorale par la voie SUMO.

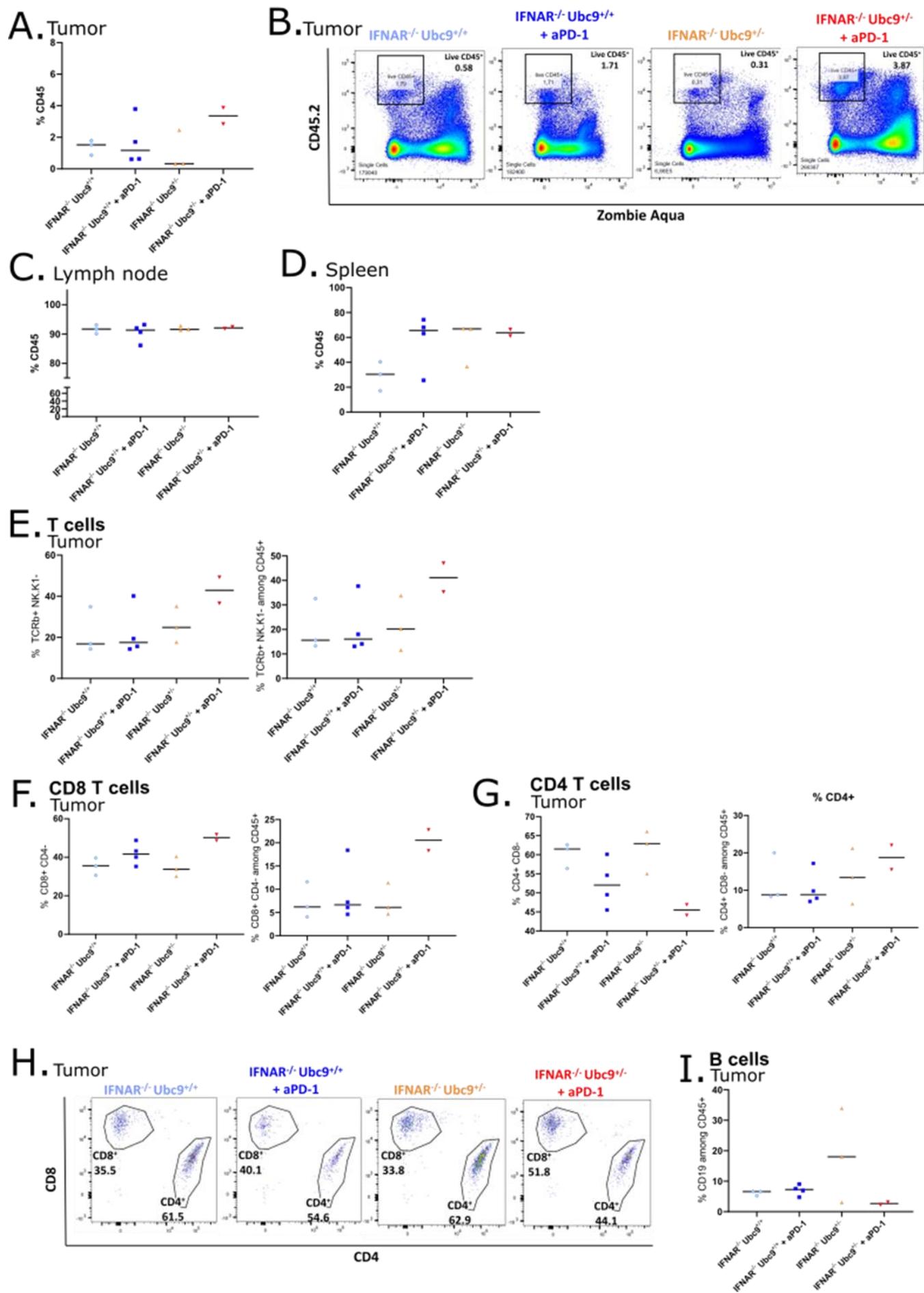


Figure 48 : Modification des proportions de cellules immunitaires lors d'une hypoSUMOylation globale couplée à une déficience en récepteur des IFN-I.

- (A) Fréquence (%) des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales des tumeurs B16F10-OVA.
- (B) *Dot plots* représentatifs de la fréquence des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales des tumeurs B16F10-OVA.
- (C-D) Fréquence des cellules CD45.2⁺ parmi les cellules totales du ganglion lymphatique drainant la tumeur (C) et de la rate (D).
- (E) Fréquence des cellules TCRb⁺NK1.1⁻ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des TCRb⁺NK1.1⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA.
- (F) Fréquence des cellules CD8⁺CD4⁻ parmi les TCRb⁺NK1.1⁻ et des CD8⁺CD4⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA.
- (G) Fréquence des cellules CD4⁺CD8⁻ parmi les TCRb⁺NK1.1⁻ et des CD4⁺CD8⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA.
- (H) *Dot plots* représentatifs de la fréquence des cellules CD8⁺CD4⁻ et CD4⁺CD8⁻ parmi les TCRb⁺NK1.1⁻ des tumeurs B16F10-OVA.

F. Représentations graphiques du scRNA-seq des cellules immunitaires infiltrant la tumeur de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-}, traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1

Dans le but d'étudier plus en détail les mécanismes d'action de SUMO dans la réponse anti-tumorale, nous avons ensuite analysé les transcriptomes des différentes populations immunitaires infiltrant la tumeur. Nous avons pour cela réalisé un scRNA-seq sur des cellules CD45.2⁺ isolées par FACS, et provenant des tumeurs B16F10-OVA de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non par anti-PD-1 (**Figure 48A**). Les analyses présentées ci-dessous sont préliminaires mais donnent un aperçu des données obtenues et fournissent des pistes intéressantes sur l'effet combiné de la perte partielle de SUMO et du traitement anti-PD-1.

Après traitement des données et contrôle qualité, un total de 54739 cellules (9909 à 17981 cellules par condition, n=3 souris par condition) a été conservé pour la suite des analyses. Chaque point correspond à une cellule et est coloré selon sa condition de départ et sa phase du cycle cellulaire (**Figure 48B et 48C**). Des groupes de cellules ont été ensuite définis de manière non-supervisée à l'aide du programme Seurat « *FindClusters* » puis inspectés manuellement. Cette analyse a donné lieu à 38 groupes représentés en UMAP (« *Uniform Manifold Approximation and Projection* ») (**Figure 48D**).

Les principaux types cellulaires ont ensuite été définis manuellement selon leurs marqueurs d'expression. Deux populations myéloïdes et lymphoïdes bien distinctes sont retrouvées et segmentées en sous-groupes correspondants à la majorité des populations immunitaires connues. L'ensemble des groupes est retrouvé en proportions semblables dans les quatre conditions, sauf pour la condition Ubc9^{+/-} + anti-PD-1 où un décalage des populations de macrophages M0/M2 vers les macrophages M1 semble avoir lieu, représenté par le cercle et la flèche rouge sur la figure (**Figure 49**).

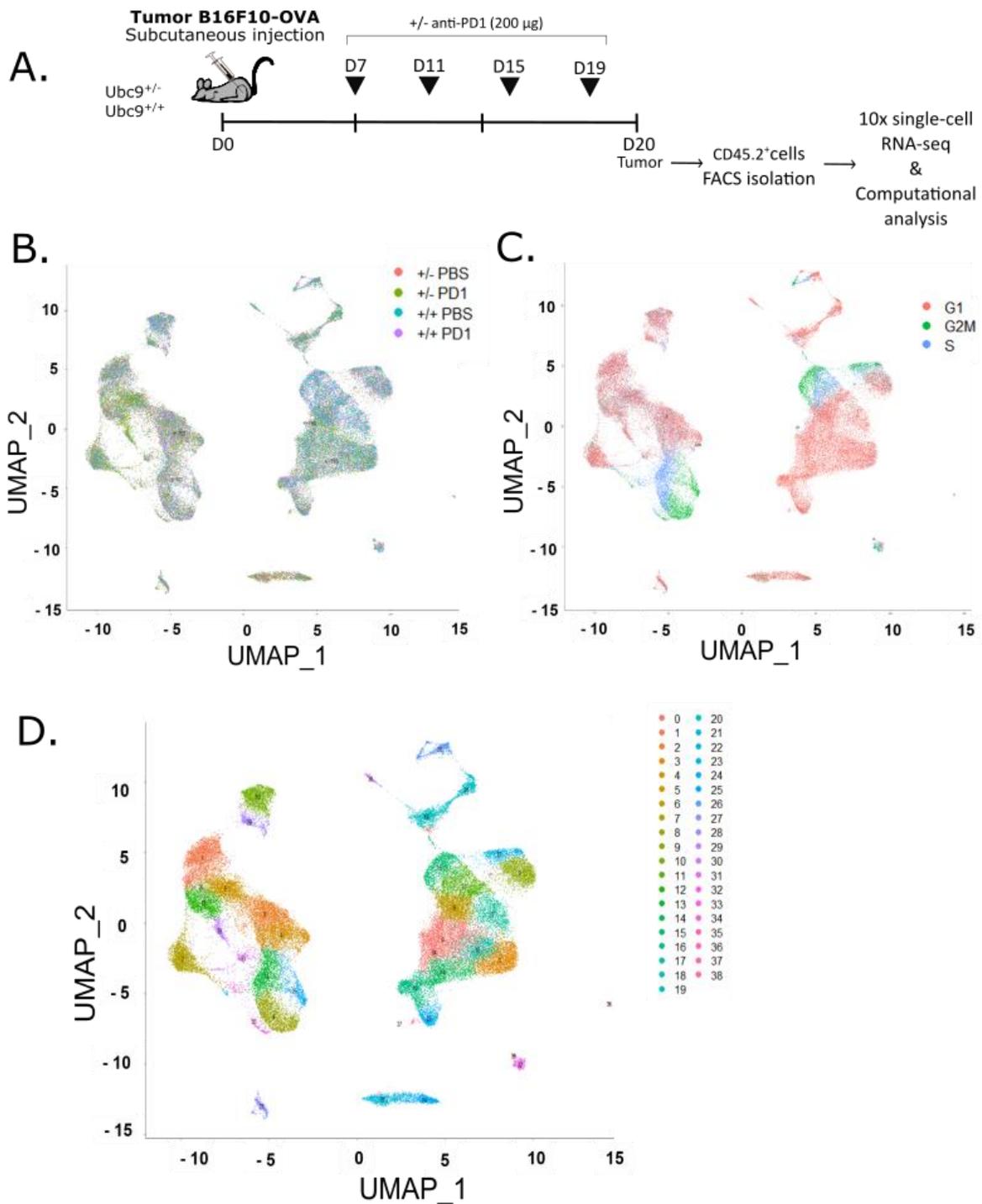


Figure 49 : Regroupement des cellules immunitaires CD45.2⁺ infiltrant la tumeur des souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A) Schéma de la conception globale de l'étude. Le séquençage de l'ARN unicellulaire a été appliqué aux cellules CD45.2⁺ isolées des tumeurs de souris ayant été inoculées avec des cellules B16F10-OVA, puis traitées ou non par anti-PD-1.

(B) Projection UMAP (« *Uniform Manifold Approximation and Projection* ») des cellules CD45.2⁺ provenant de 12 échantillons (3 par groupe), colorées selon l'origine de l'échantillon, et ayant passé le contrôle qualité. Chaque point correspond à une cellule.

(C) Projection UMAP en deux dimensions des cellules CD45.2⁺ totales dans différentes phases du cycle cellulaire. Chaque point correspond à une cellule.

(D) Projection UMAP en deux dimensions des cellules CD45.2⁺ totales montrant 38 groupes de cellules basés sur leur profil d'expression génique (Seurat). Chaque point correspond à une cellule.

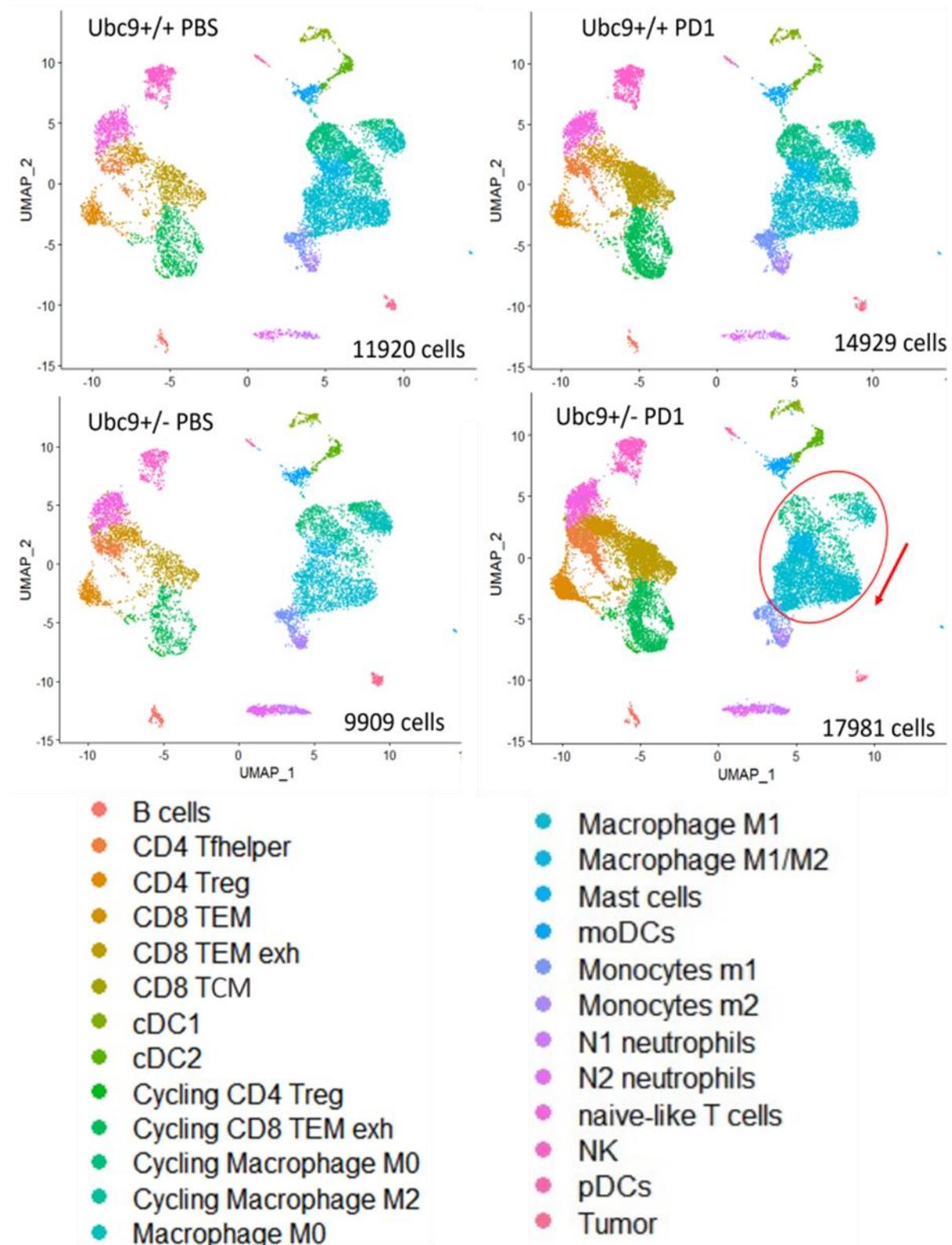


Figure 50 : Représentation des principaux types cellulaires parmi les cellules CD45.2⁺ infiltrant la tumeur de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-}, traitées ou non avec de l'anti-PD-1.

Projection UMAP des cellules CD45.2⁺ par conditions, colorées selon le type cellulaire, et ayant passé le contrôle qualité. Chaque point correspond à une cellule.

G. Un déficit de la voie SUMO couplé au traitement anti-PD-1 entraîne la présence d'une proportion plus élevée de cellules T cytotoxiques dans la tumeur

La thérapie par blocage des points de contrôle est décrite dans la littérature comme reprogrammant les lymphocytes T épuisés, voir anergiques infiltrant la tumeur, en lymphocytes fonctionnels et cytotoxiques (Lee et al., 2015). Afin de vérifier si la thérapie anti-PD-1 avait un effet sur le niveau d'épuisement des lymphocytes T au sein de nos données, et si cet effet était augmenté lorsque la thérapie était couplée à une hypoSUMOylation, nous avons analysé le score de différentes signatures d'épuisement et d'activation précoce dans les cellules lymphoïdes (Andreatta et al., 2021). En comparant les scores d'enrichissement de ces signatures dans les groupes de cellules T effecteurs mémoire (TEM), qui correspondent aux lymphocytes cytotoxiques, nous pouvons observer un gradient d'expression de la signature d'épuisement anti-corrélé avec le gradient d'expression de la signature d'activation. Ces signatures ont montré, respectivement, des niveaux d'expression croissants et décroissants dans les groupes de 5 à 4 (**Figure 50A**). Il semble donc que les cellules les moins épuisées se trouvent dans le groupe 5, et celles les plus épuisées dans le groupe 4, le groupe 2 étant un groupe intermédiaire. La flèche rouge représente ainsi la trajectoire des cellules des plus activées (groupe 5) au moins activées (groupe 4). Ces signatures sont également représentées en *Violin Plot* dans ces trois groupes et soulignent l'effet anti-corrélé des gradients d'expression des deux signatures représentées en UMAP (**Figure 50B et 50D**). De plus, les scores des signatures d'épuisement « précoce » (cellules T CD8 dite « *precursor exhausted* ») et de cytotoxicité viennent confirmer ces données (**Figure 50B et 50D**). Un marqueur d'épuisement (Havcr2) et de cytotoxicité (Gzma) sont également représentés en *Violin Plot* et en UMAP (**Figure 50C et 50E**).

Ces résultats suggèrent donc un modèle de progression linéaire de la cellule effectrice activée peu épuisée et très cytotoxique à la cellule effectrice très épuisée et dysfonctionnelle. Par ailleurs, la classification des cellules T que nous avons effectuée au sein de nos données révèlent une progression connue de ces cellules d'un stade dit « naïf », à un stade dit « *central memory* » (TCM) où le lymphocyte ne possède que très peu de fonctions effectrices, puis à un stade T effecteur mémoire avec une forte activité effectrice pour finir progressivement par devenir anergique et perdre ses fonctions (cellules que nous avons appelées « TEM exh ») (**Figure 49 et 50A**). C'est parmi ces deux dernières catégories que se classent les groupes 5, 2 et 4.

Nous avons ensuite quantifié la proportion de ces trois groupes dans les données de scRNA-seq provenant des souris $Ubc9^{+/+}$ et $Ubc9^{+/-}$ traitées ou non par anti-PD-1. Les résultats révèlent que la proportion de cellules appartenant au groupe 5, le groupe le plus cytotoxique, est plus importante chez les souris $Ubc9^{+/-}$ + anti-PD-1 que chez les $Ubc9^{+/-}$ non traitées ($p=4.8*10^{-14}$) et les $Ubc9^{+/+}$ traitées ($p=0$), tandis que celle des deux groupes 2 et 4, bien qu'augmentée sous traitement, ne diffère pas avec l'effet additif de l'hypoSUMOylation. Ces résultats suggèrent donc que chez les souris recevant un traitement anti-PD-1, les lymphocytes T ayant une activité effectrice sont bien présents en proportions supérieures dans la tumeur, mais présentent un phénotype épuisé. Chez les souris présentant en plus un déficit de la voie SUMO, la population de cellules T effectrices ayant la plus forte activité cytotoxique et présentant le moins de caractéristiques d'épuisement est surreprésentée par rapport aux autres groupes. Cette reprogrammation des cellules T épuisées en cellules T fonctionnelles, ou le maintien des lymphocytes T à un stade précédant l'épuisement pourrait ainsi expliquer l'effet anti-tumoral observé chez les souris $Ubc9^{+/-}$ + anti-PD-1.

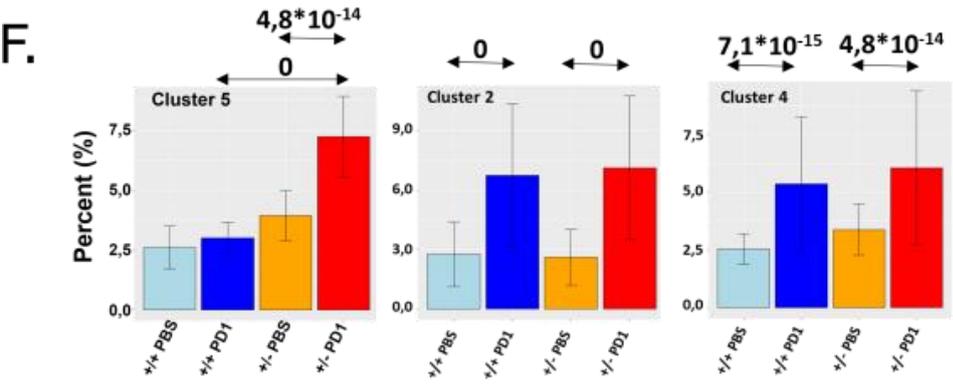
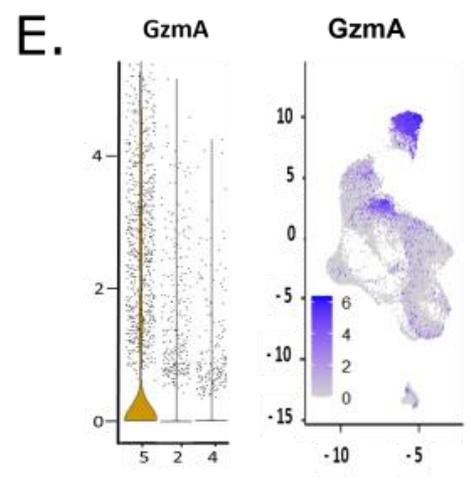
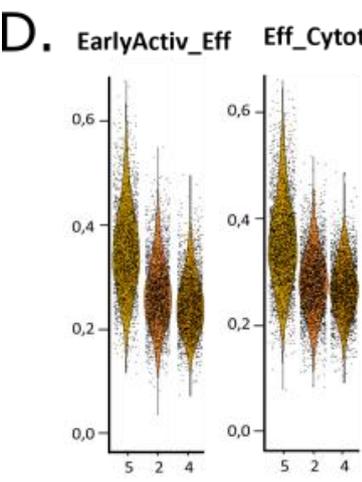
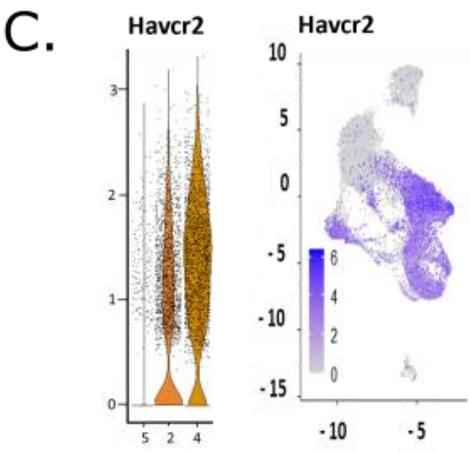
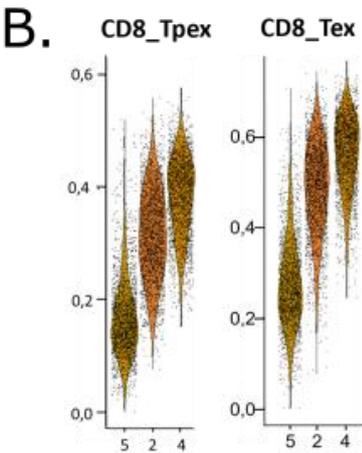
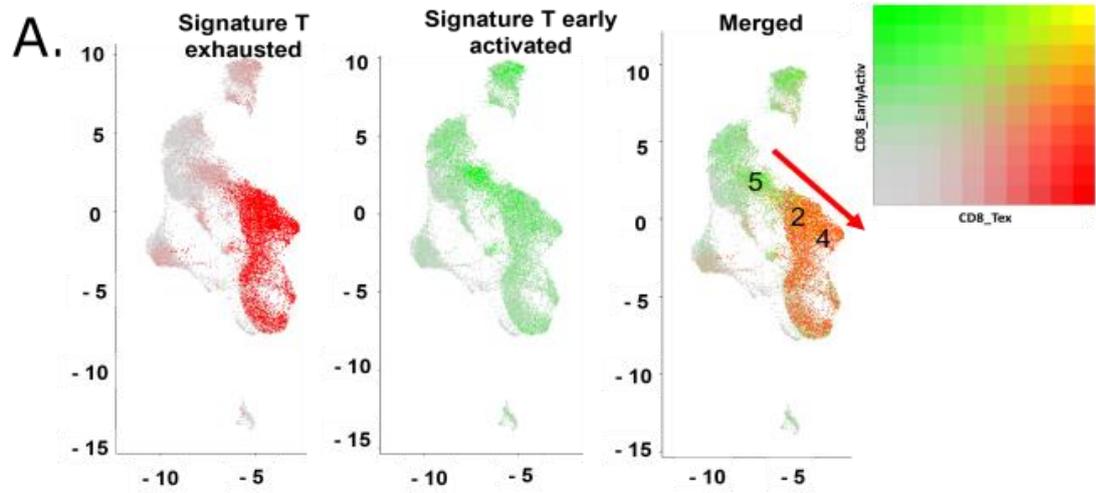


Figure 51 : Augmentation de la proportion de cellules T cytotoxiques chez les individus Ubc9^{+/-} + anti-PD-1.

(A) Projection UMAP des cellules CD45.2⁺ totales représentant leur distribution selon leur score de signature d'épuisement (rouge) et d'activation (vert). La flèche rouge représente la trajectoire des cellules des plus activées (groupe 5) au moins activées (groupe 4). Chaque point correspond à une cellule.

(B-C) *Violin plot* montrant la distribution des scores de signature d'épuisement « précoce » (cellules T CD8 dite « *precursor exhausted* ») et « tardif » (cellules T CD8 dite « *exhausted* ») (B) et représentation en UMAP et *Violin plot* d'un marqueur associé à cet état d'épuisement (C).

(D-E) *Violin plot* montrant la distribution des scores d'activation et de cytotoxicité des cellules T CD8 (D) et représentation en UMAP et *Violin plot* d'un marqueur associé à cet état de cytotoxicité (E).

(F) Pourcentage (%) de cellules présentes dans les groupes Seurat 5,4 et 2 selon les groupes de souris hypoSUMOylées ou non et traitées ou non par anticorps anti-PD-1.

H. L'hypoSUMOylation couplée au traitement anti-PD-1 entraîne une diminution des macrophages présentant un phénotype M0/M2 pro-tumoral

Comme il a été mentionné dans l'introduction de ce document, il existe plusieurs populations de macrophages. De manière simplifiée, les macrophages M0 inactifs se différencient en macrophages M1 anti-tumoraux ou en macrophages M2 pro-tumoraux (Lawrence and Natoli, 2011).

Après avoir défini les différentes populations immunitaires et les avoir représentées en UMAP selon les conditions, une modification des proportions de macrophages pro-tumoraux au profit des populations anti-tumorales était observable chez les souris Ubc9^{+/-} recevant un traitement anti-PD-1. Afin de vérifier cette observation, nous avons récupéré des signatures transcriptomiques de macrophages M0, M1 et M2 publiées et nous les avons appliquées aux populations myéloïdes intra-tumorales (**Figure 51A**) (Orecchioni et al., 2019). Puis, nous avons quantifié la proportion de macrophages présentant un phénotype M0, M1, M1/M2 et M2 dans les données de scRNA-seq provenant de nos quatre conditions. Ces résultats démontrent une forte diminution des macrophages M0 chez les Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux Ubc9^{+/+} traitées et aux Ubc9^{+/-} non-traitées (p=0), de même que pour les macrophages M2 (respectivement, p=0 et 4*10⁻¹⁴) (**Figure 51B**). Une plus faible diminution des populations de macrophages inactifs

et pro-tumoraux est également retrouvée dans les souris WT sous traitement anti-PD-1, montrant ainsi l'effet anti-tumoral de la thérapie, mais n'égalant pas l'effet conjoint de l'hypoSUMOylation et de la thérapie anti-PD-1. La proportion de macrophages présentant un phénotype M1 présente en revanche une légère hausse chez les souris Ubc9^{+/-} traitées par rapport aux Ubc9^{+/-} non-traités ($p=3*10^{-14}$) et aux Ubc9^{+/+} traitées ($p=8,1*10^{-7}$), bien qu'il soit surprenamment égal à celui des Ubc9^{+/+} non-traitées. La population intermédiaire M1/M2 est quant à elle moins présente chez les Ubc9^{+/-} traitées ou non.

Ainsi, l'action combinée de l'immunothérapie par blocage des points de contrôle et de l'hypoSUMOylation semble entraîner une nette diminution des macrophages pro-tumoraux au profit d'une augmentation des macrophages ayant une activité anti-tumorale.

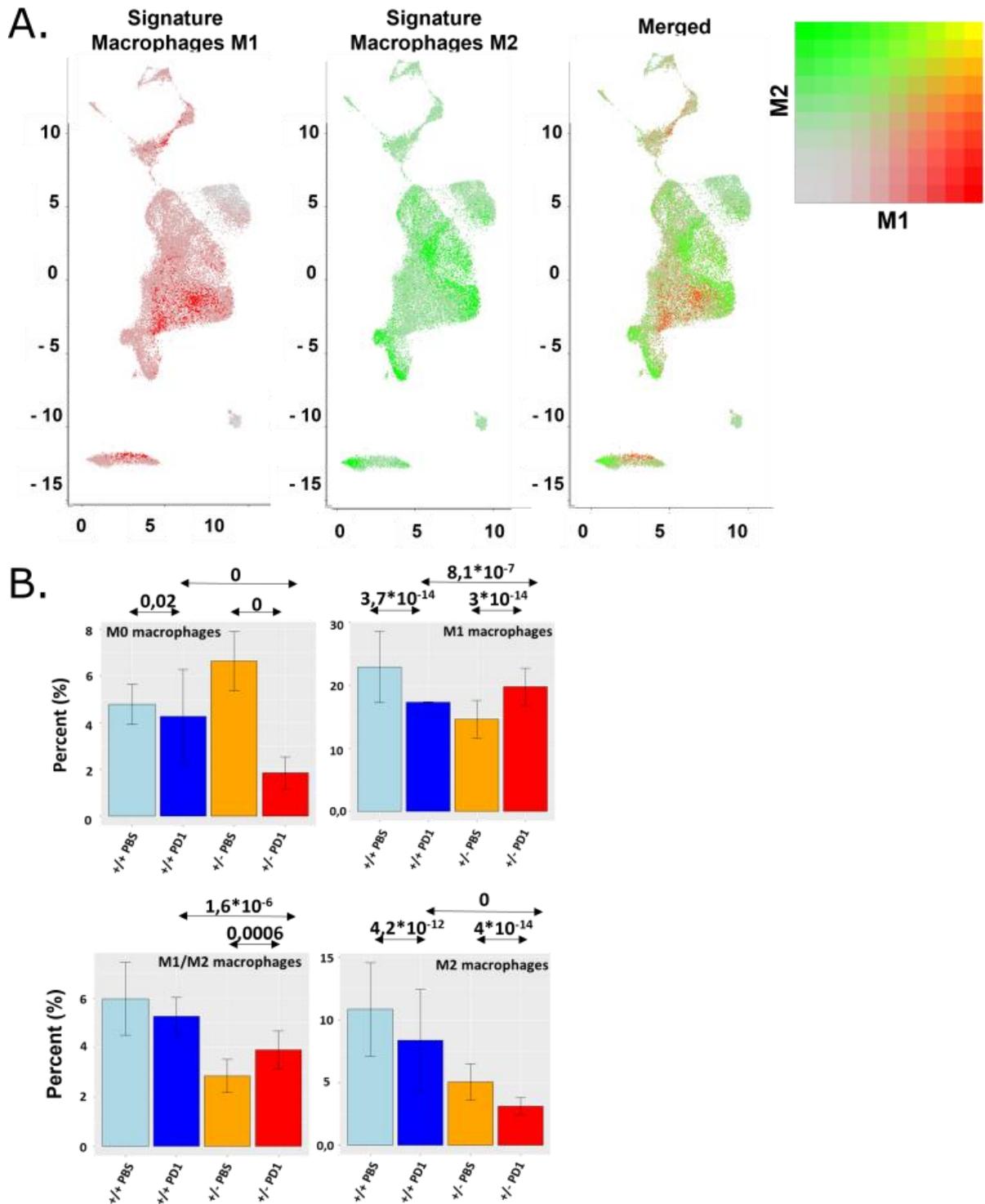


Figure 52 : Diminution de la proportion de macrophages naïfs et pro-tumoraux lors d'une hypoSUMOylation couplée à la thérapie anti-PD-1.

(A) Projection UMAP des cellules CD45.2⁺ totales représentant leur distribution selon leur score de signature de macrophages M1 (rouge) et M2 (vert). Chaque point correspond à une cellule.

(B) Proportion (%) de macrophages M0, M1, M1/M2 et M2 selon les groupes de souris hypoSUMOylées ou non et traitées ou non par anticorps anti-PD-1.

I. Signature interféron de type-I selon les groupes de souris $Ubc9^{+/+}$ et $Ubc9^{+/-}$ traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1

Afin de mieux comprendre l'implication de la voie interféron de type I dans ce modèle tumoral, nous avons comparé le score d'enrichissement en signature IFN-I (GO:0060337) entre les différentes conditions (**Figure 52A**). De manière générale et comme attendu, le traitement anti-PD-1 entraîne un enrichissement de la signature IFN-I dans les cellules immunitaires. Toutefois, l'hypoSUMOylation ne semble pas amplifier cet enrichissement.

Nous avons ensuite appliqué cette signature aux 38 groupes Seurat (**Figure 52B**), puis quantifié la proportion des cellules enrichies en signature IFN-I dans les données de scRNA-seq provenant de nos quatre conditions. Les groupes les plus enrichis correspondent aux macrophages M1 (groupes 14, 18 et 34) et au groupe 5 correspondant au CD8 TEM (T effecteurs mémoire) activés et peu épuisés que nous avons déjà présentés. Les proportions des macrophages présentant un enrichissement IFN-I ne sont pas plus importantes dans les souris $Ubc9^{+/+}$ + anti-PD-1. Toutefois et comme détaillé précédemment, une proportion plus élevée de cellules CD8 TEM peu épuisées et enrichies en signature IFN-I est retrouvée chez les souris hypoSUMOylées et traitées. La voie SUMO semble réguler négativement l'IFN-I en érigeant une barrière épigénétique s'opposant à la reprogrammation par l'anti-PD-1 des cellules CD8 TEM exh en cellules CD8 TEM. Les CD8 TEM $Ubc9^{+/-}$ progressent dans leur trajectoire d'épuisement, mais la barrière épigénétique n'est plus aussi efficace et permet une reprogrammation efficace des CD8 TEM exh en CD8 TEM. Ces résultats sont toutefois préliminaires et nécessitent d'être nuancés. De plus amples analyses sont nécessaires afin de valider cette hypothèse, telles que la comparaison du score d'enrichissement pour l'IFN-I et l'analyse des voies biologiques associées aux gènes différentiellement exprimés par condition dans ces cellules.

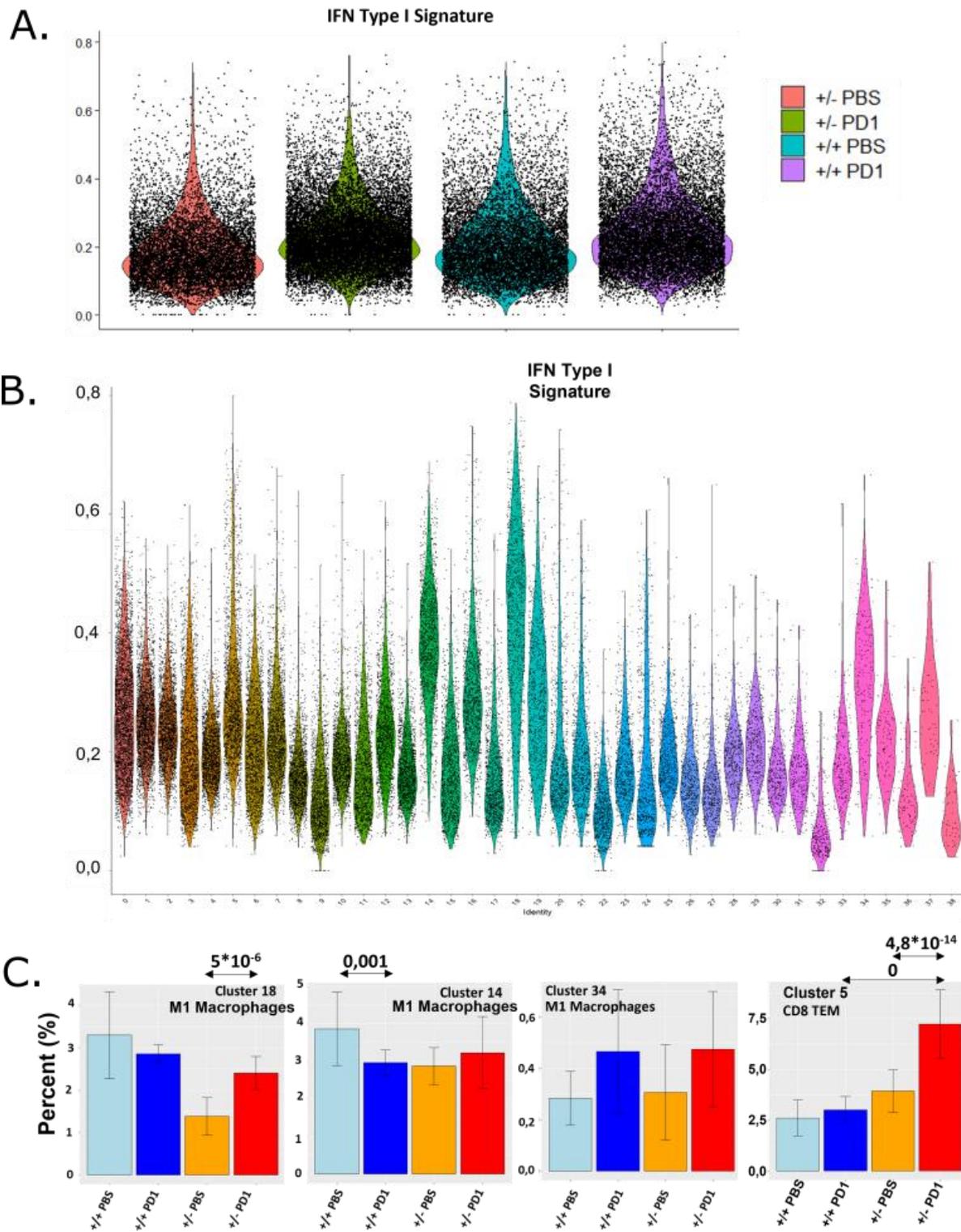


Figure 53 : Signature interféron de type-I selon les groupes de souris $Ubc9^{+/+}$ et $Ubc9^{+/-}$ traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A) Violin plot montrant la distribution du score de la signature IFN-I selon les groupes de souris $Ubc9^{+/+}$ et $Ubc9^{+/-}$, traités ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(B) Violin plot montrant la distribution du score de la signature IFN-I des cellules $CD45.2^+$ totales selon les groupes Seurat.

(C) Proportion (%) de cellules présentes dans des groupes Seurat enrichis en signature IFN-I (18, 14, 34 et 2) selon les groupes de souris hypoSUMOylées ou non et traitées ou non par anticorps anti-PD-1.

J. Conclusion

Nous avons donc démontré que la SUMOylation jouait un rôle majeur dans la régulation de l'immunité anti-tumorale. Une hypoSUMOylation couplée à un traitement anti-PD-1 entraîne un retard de la croissance tumorale conduisant parfois au rejet total de la tumeur. Nous avons montré que ce retard mettait en jeu à la fois les populations myéloïdes et lymphoïdes et impliquait la voie interféron de type I. Nos résultats ont mis un avant une action de la SUMOylation à différents niveaux. Dans les populations myéloïdes, une hétérozygotie d'Ubc9 entraîne une diminution des macrophages pro-tumoraux, tandis que les lymphocytes présentent un phénotype moins épuisé et plus actif. De nombreuses données de cette étude restent encore à être exploitées mais les résultats actuels semblent d'ores et déjà souligner un rôle régulateur global de SUMO sur les effecteurs de l'immunité anti-tumorale.

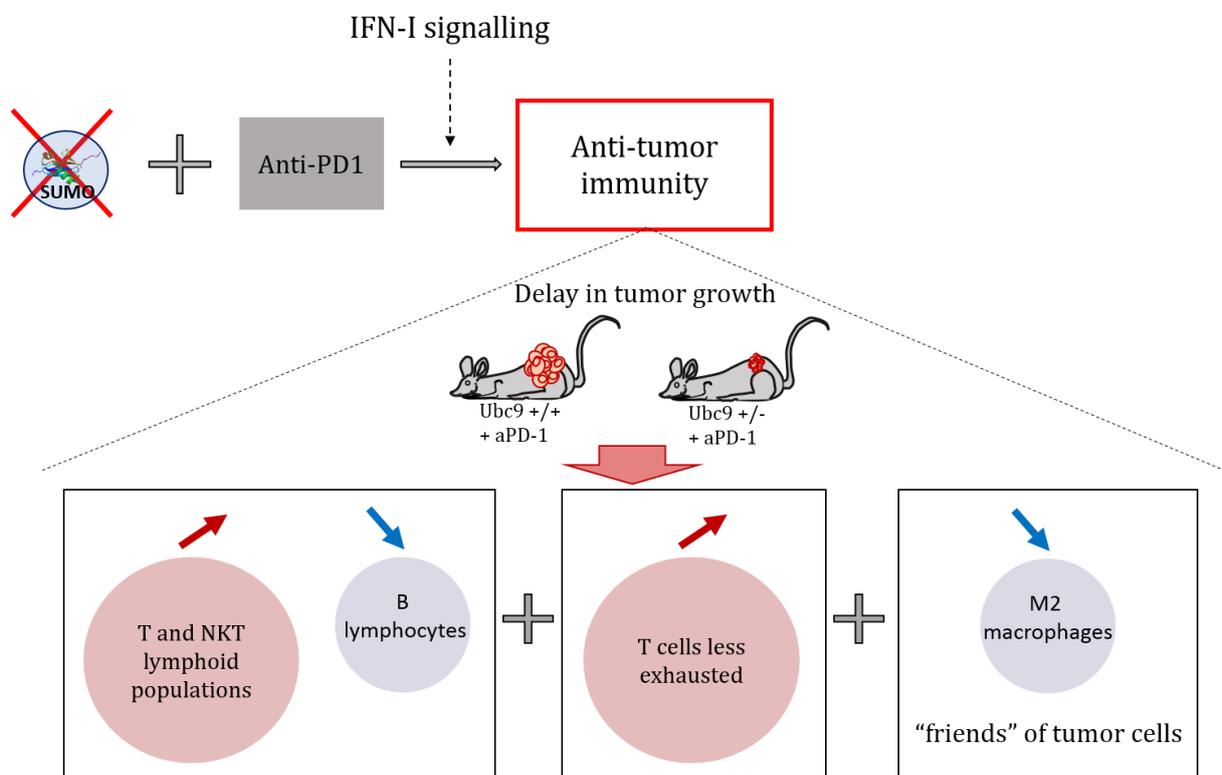


Figure 54: Schéma récapitulatif de l'action d'une hypoSUMOylation couplée à un traitement anti-PD1 In vivo.

III. SUMO et régénération musculaire

A. Contexte général de l'étude

Comme détaillé dans l'introduction, SUMO joue un rôle majeur dans le contrôle de la plasticité cellulaire, et fonctionne comme une barrière aux changements d'identité cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Cossec et al., 2018). Or, ces dernières années, plusieurs études ont souligné l'implication des régulateurs de l'identité cellulaire lors du processus de réparation tissulaire (Mosteiro et al., 2016, 2018). En effet, le changement de destin cellulaire est essentiel lors de la régénération de tissus endommagés ou nécessitant un renouvellement constant. Le remplacement de cellules endommagées peut être obtenu grâce à la différenciation des cellules souches et/ou la prolifération et la conversion de cellules matures (Jessen et al., 2015). La conversion cellulaire est donc un phénomène de grand intérêt dans le cadre de la médecine régénérative, et les facteurs régulant les changements de destin cellulaire tels que SUMO deviennent des candidats centraux dans la régénération tissulaire.

Le muscle squelettique possède un développement et une croissance prodigieuse ainsi que de grandes capacités régénératrices dont l'origine provient des aptitudes de prolifération et de différenciation des cellules souches satellites. La régénération tissulaire du muscle squelettique constitue donc un modèle de choix pour l'étude de facteurs régulant la plasticité et la conversion cellulaire tels que SUMO. De plus et comme discuté auparavant, la SUMOylation a également été montrée comme impliquée dans la régulation de facteurs de transcription participant au processus de myogenèse.

Par conséquent, mon troisième projet vise à évaluer le rôle de la voie SUMO dans le devenir des cellules satellites au cours de la myogenèse et à analyser sa contribution au cours du processus de régénération musculaire suivant une lésion aigue ou chronique. Pour cela, nous avons réalisé des tests de différenciation *in vitro* sur des cellules provenant de souris hypoSUMOylées, et induit des blessures musculaires dans des modèles murins hypoSUMOylés ou non afin de comparer leur capacité de régénération musculaire.

B. Une hypoSUMOylation entraîne une myogenèse accélérée *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier le rôle de SUMO dans le processus de myogenèse dont les étapes peuvent être récapitulées *in vitro* par des modèles de différenciation de cellules satellites. Pour cela, nous avons croisé un modèle de souris rapporteur Tg:Pax7-nGFP dont les cellules souches satellites expriment la GFP avec des souris hétérozygotes ou homozygotes pour Ubc9. Nous avons ensuite disséqué les muscles des membres de ces souris, dissocié les cellules, puis isolé les cellules Pax7⁺-GFP par tri cellulaire. Ces cellules ont ensuite été mises en culture dans des conditions favorables à leur prolifération, activation, différenciation et fusion. Afin d'évaluer l'état de différenciation des cellules au cours du processus de myogenèse, les cellules hypoSUMOylées et WT ont été soumises toutes les 24h à des analyses de morphologie et d'expression (RT-qPCR et immunohistochimie (IHC)) sur une période de 10 jours. En parallèle, la prolifération a été évaluée par insertion d'EdU dans le milieu 2h avant la fixation des cellules (**Figure 53A**).

Dès 24h, une augmentation significative de la fréquence des cellules en prolifération EdU⁺ peut être observée dans les cellules Ubc9^{+/-} par rapport aux WT (10% dans les Ubc9^{+/-} VS 4,6% dans les Ubc9^{+/+}, p= 0,0062) (**Figure 53C**). Bien que cette augmentation ne devienne qu'une tendance au bout de 48h (38,5% dans les Ubc9^{+/-} VS 30% dans les Ubc9^{+/+}, p= 0,1122), et 72h (34,5% dans les Ubc9^{+/-} VS 27% dans les Ubc9^{+/+}, p= 0,1122), elle est accompagnée par une diminution significative de cellules satellites Pax7⁺ à 48h (104% dans les Ubc9^{+/-}, VS 93% dans les Ubc9^{+/+}, p= 0,0021) et à 72h (102% dans les Ubc9^{+/-}, VS 96% dans les Ubc9^{+/+}, p= 0,0235) (**Figure 53B, 53D, 53E**).

Le nombre absolu de cellules DAPI⁺ est également significativement augmenté aux jours 3, 5 et 8 (respectivement p=0,004329, p= 0,002165 et p=0,002165) jusqu'au jour 8 et témoigne de la prolifération accrue des cellules Ubc9^{+/-}. Il y a trois fois plus de cellules Ubc9^{+/-} que de cellules WT à jour 5. En plus de proliférer plus rapidement, les cellules Ubc9^{+/-} sont activées plus rapidement et l'expression de MyoD est observable en IHC dès 18h (donnée non-

montrée).

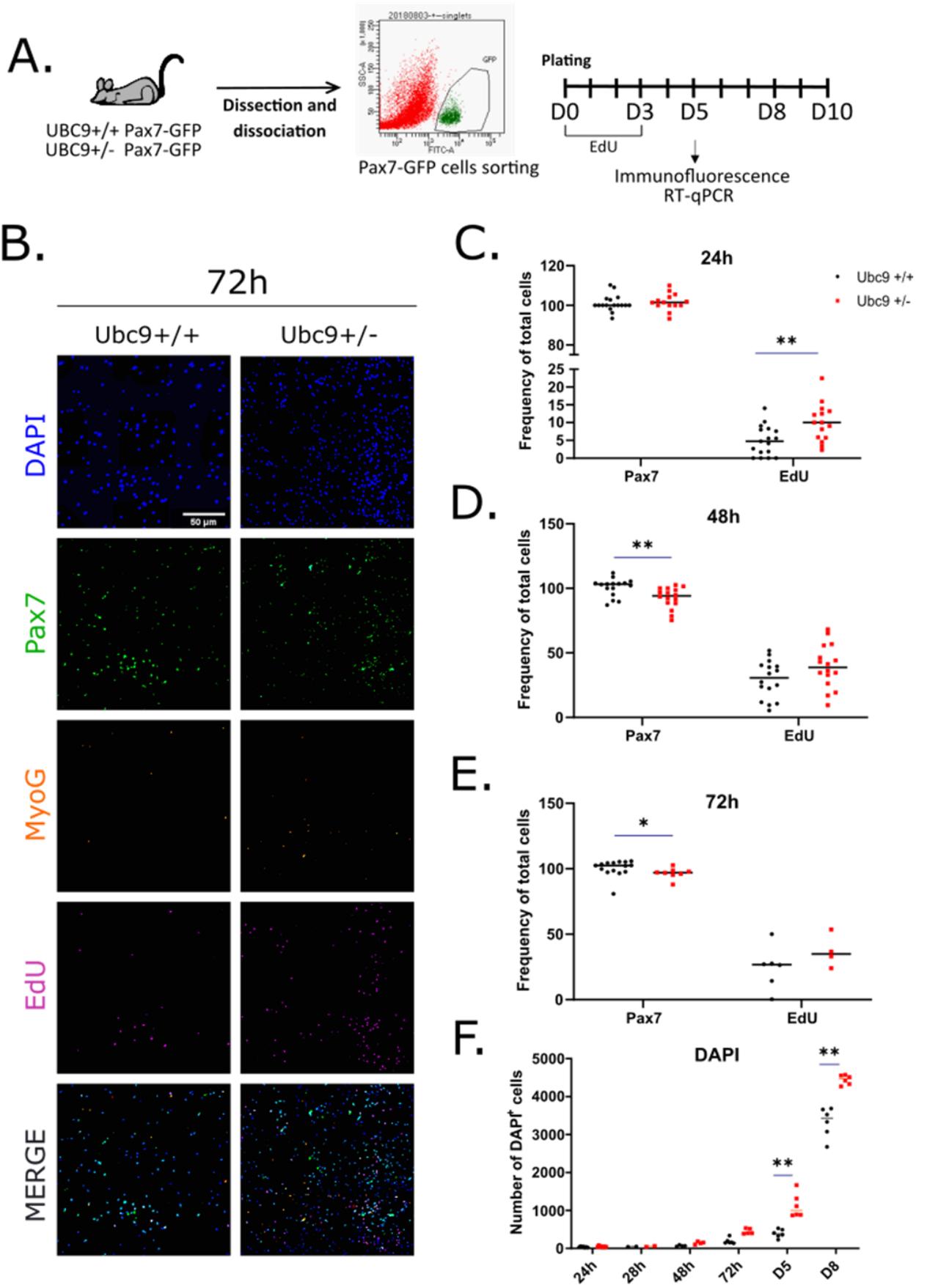


Figure 55 : Prolifération accrue des cellules souches satellites hypoSUMOylées.

(A) Schéma du protocole de mise en culture des cellules souches satellites provenant de souris WT ou Ubc9^{+/-}.

(B) Immunofluorescence de cellules souches satellites provenant de souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} après 72h de culture. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu). L'EdU a été ajouté 2h avant la fixation des cellules et marque les cellules en cours de division cellulaire (violet). Pax7 (vert) et MyoG (orange) marquent respectivement les cellules souches satellites et les myoblastes. Barre d'échelle : 50 μ m.

(C-E) Pourcentage de cellules positives pour Pax7 et pour l'EdU à 24h (C), 48h (D), et 72h (E) (n = 3 souris sauf pour 72h où n=2 souris, chaque point représente un puit de culture).

(F) Cinétique représentative de la quantification de cellules DAPI⁺ lors du processus de myogenèse *in Vitro*. (n = 1 souris)

Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. **p*<0,05 ; ***p*<0,01.

Lors des étapes plus tardives de la myogenèse, les cellules Ubc9^{+/-} présentent toujours une proportion inférieure de cellules souches satellites par rapport aux Ubc9^{+/+}, en faveur d'une augmentation des cellules MyoG⁺. Au jour 5, il y a 67% de cellules satellites dans les Ubc9^{+/-} tandis qu'il y en a 80% chez les Ubc9^{+/+} (*p*= 0,0022) et il y a presque quatre fois plus de myoblastes différenciés exprimant la Myogénine dans les Ubc9^{+/-} (*p*= 0,0022) (**Figure 54A et 54B**). Les résultats de qPCR rapportent une expression de la Myogénine trois fois plus importante chez les hétérozygotes que chez les homozygotes. Surprenamment, le niveau d'expression de Pax7 reste le même entre les cellules Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} (**Figure 54D**). Ces résultats sont retrouvés à jour 8 avec 40% de cellules Pax7⁺ et 55% de cellules MyoG⁺ chez les WT, contre 28% de cellules Pax7⁺ et 82% de cellules MyoG⁺ chez les Ubc9^{+/-} (respectivement *p*= 0,0061 et *p*= 0,0242). Ils sont corrélés à une augmentation de l'expression de Myogénine observés en qPCR (**Figure 54A, 54C, et 54E**).

L'hypoSUMOylation des cellules souches satellites mène donc à une prolifération plus rapide de ces cellules associée à une différenciation précoce *in vitro*, ce qui est en accord avec le rôle de barrière épigénétique aux changements d'état cellulaire attribué à SUMO. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être répétés afin de valider les phénotypes observés. Notamment, l'ajout d'un inhibiteur du cycle cellulaire permettrait de confirmer que SUMO agit directement sur la prolifération des cellules Pax7⁺ et que les différences observées ne proviennent pas en réalité d'une mort cellulaire plus importante chez les +/+ par rapport aux +/- au cours de la myogenèse. Ces résultats pourraient également être confirmés par des études de différenciation

sur des lignées cellulaires musculaires telles que la lignée C2C12 avec ajout ou non de l'inhibiteur de la voie SUMO ML-792. Le phénotype que l'on observe pourrait de ce fait être accentué, car la perte de la voie SUMO serait plus importante que 50%. Cependant, une perte trop importante de la SUMOylation entraînant le blocage de la mitose, il faudrait auparavant réaliser des tests de dosage afin de définir la fenêtre d'hypoSUMOylation optimale pour favoriser la différenciation (Dasso, 2008). L'utilisation d'un inhibiteur chimique de la SUMOylation permettrait également d'utiliser des modèles de co-culture cellulaire, et ainsi de se rapprocher des conditions physiologiques de différenciation musculaire. Enfin, ces données ne permettent pas de conclure sur les étapes terminales de la différenciation, qui correspondent à la fusion des myoblastes pour former les myotubes. Il faudrait pour cela réaliser des mesures d'indice de fusion, c'est-à-dire calculer le nombre de noyaux inclus dans un myotube par rapport au nombre total de noyaux.

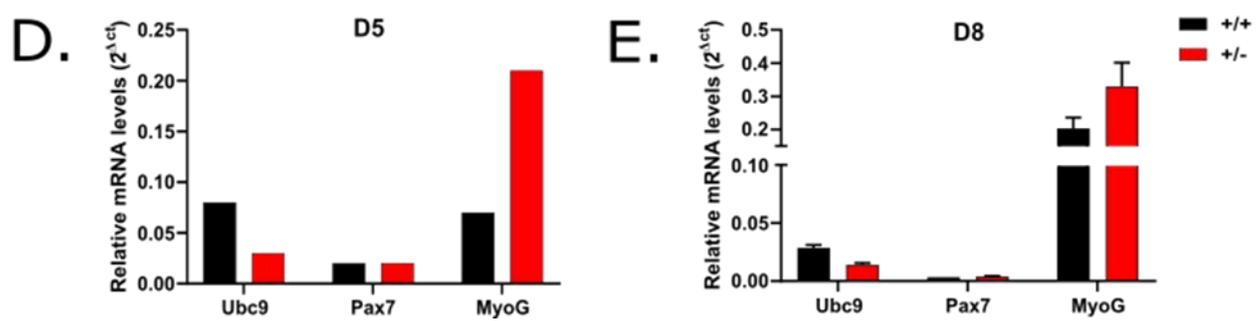
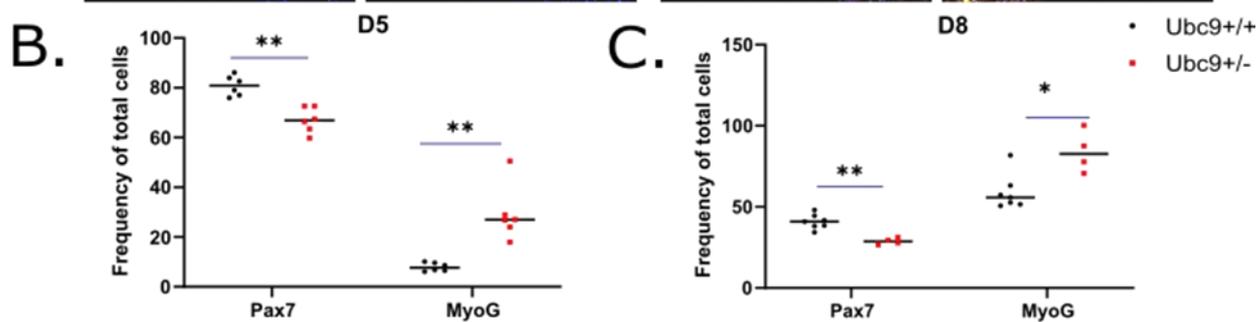
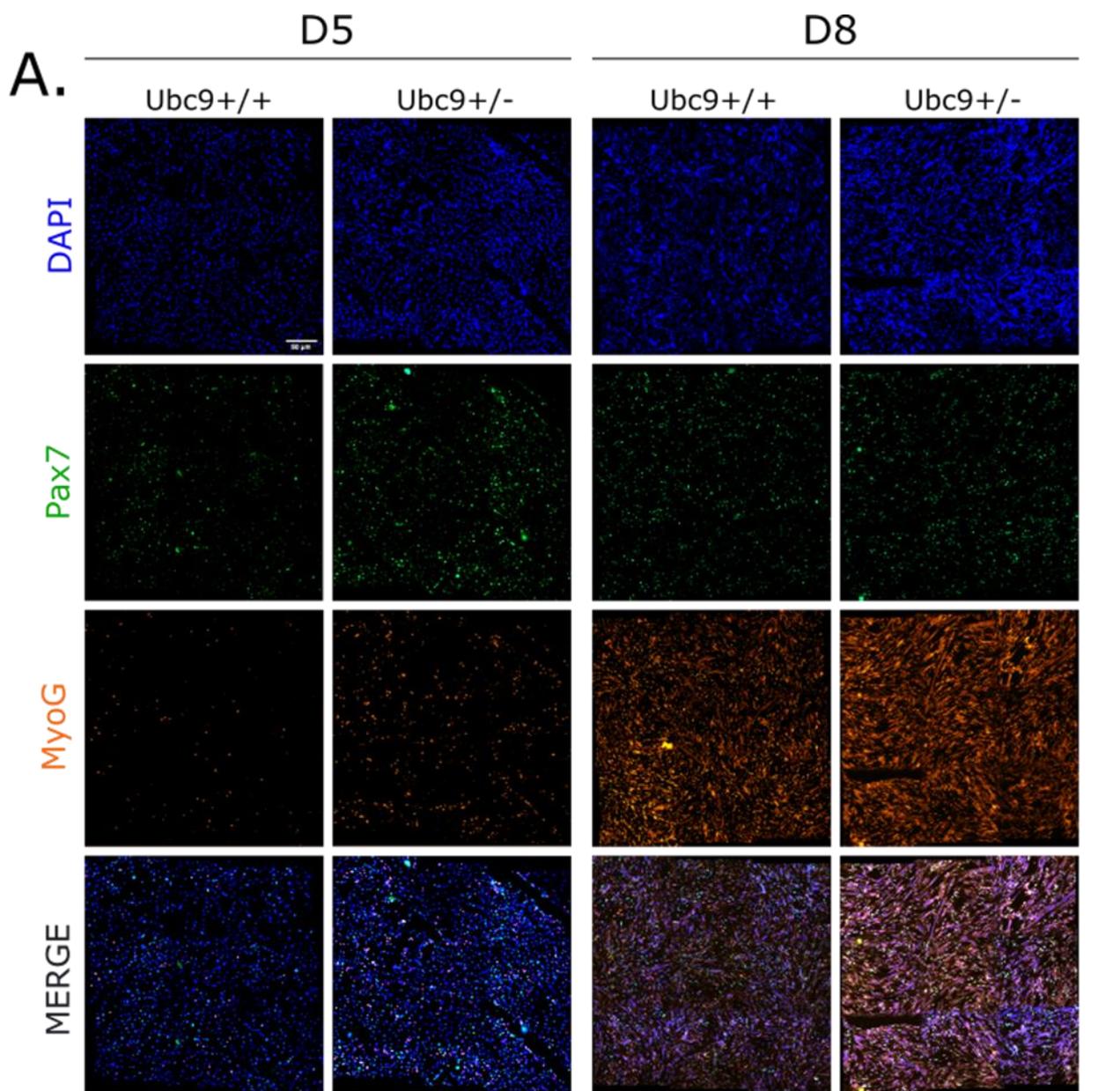


Figure 56 : Différentiation précoce des cellules souches satellites hypoSUMOylées.

(A) Immunofluorescence de cellules souches satellites provenant de souris $Ubc9^{+/+}$ ou $Ubc9^{+/-}$ après cinq et huit jours de culture. Les noyaux cellulaires ont été colorés avec du DAPI (bleu). Pax7 (vert) et MyoG (orange) marquent respectivement les cellules souches satellites et les myoblastes. Barre d'échelle : 50 μm .

(B-C) Pourcentage de cellules positives pour Pax7 et pour MyoG à cinq (B) et huit jours de culture (C) (n = 2 souris, chaque point représente un puit de culture).

(D-E) Niveaux relatifs d'ARNm d'*Ubc9*, *Pax7* et *MyoG* à cinq (D) et huit jours de culture (E) (respectivement n=1 et n=2 souris)

Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

C. SUMO est un régulateur de la myogenèse *in vivo*

Après avoir démontré *ex-vitro* le rôle de SUMO dans le processus de myogenèse, nous avons voulu étudier son impact dans le phénomène de régénération tissulaire. Dans ce but, du BaCl_2 a été injecté dans des souris $Ubc9^{+/+}$ ou $Ubc9^{+/-}$ au niveau du tibia antérieur gauche afin d'induire une lésion musculaire aigue. Les muscles ont ensuite été disséqués et analysés en histologie au stade basal et à 3, 7, 14 et 28 jours après induction de la lésion (**Figure 55A**).

Des analyses histologiques en hématoxyline & éosine ont été réalisées sur des cryosections de muscles lésés (G) ou non (D) provenant de souris $Ubc9^{+/+}$ ou $Ubc9^{+/-}$. Ce marquage colore tous les composants de la cellule selon leur acidophilie permettant ainsi d'observer toutes les structures cellulaires et ainsi de valider notre modèle de lésion musculaire (Fischer et al., 2008). En effet, on peut observer au stade basal une structure musculaire classique, avec la présence de cellules satellites en périphérie des fibres, tandis que trois jours après injection de BaCl_2 , la majorité des fibres ont nécrosé et ont été remplacées par un important infiltrat immunitaire. Au bout de 28 jours, la régénération est complète, et les fibres nouvellement générées présentent des noyaux centronuclés (**Figure 55B**). La distribution du nombre de fibres selon leur diamètre au sein des muscles lésés montre un nombre élevé de fibres fines au début du processus de régénération (pic du nombre de fibres entre 0,25 et 0,5 mm^2 à jour 3). Cette distribution évolue au cours du processus vers une majorité de fibres de plus en plus larges, ce qui est en adéquation avec le modèle de régénération musculaire (**Figure 55B-F**). Aucune différence notable n'est à souligner aux jours 3, 7 et 14, toutefois, la distribution du nombre de fibres par diamètre est légèrement décalée vers la droite à 28 jours

(pic autour de 1-2 mm² chez les Ubc9^{+/+} et 2-3 mm² chez les Ubc9^{+/-}, ns). Cela indique que les fibres sont globalement légèrement plus larges chez les Ubc9^{+/-}, ce qui est un signe de meilleure régénération. Toutefois, la moyenne du diamètre des fibres est la même à tous les temps après lésion entre les membres lésés des souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} (**Figure 55G-J**).

La fibrose, identifiée par le Rouge Sirius, est caractérisée par la migration et la prolifération des fibroblastes au niveau du site de la lésion. Les fibroblastes produisent des protéines de la matrice extracellulaire qui viennent remplacer le tissu musculaire et compromettent la régénération musculaire. Le marquage au Rouge Sirius ne révèle aucune fibrose apparente chez les individus homo- et hétérozygotes pour Ubc9, ce qui témoigne d'une bonne régénération au sein des deux groupes (**Figure 55B**).

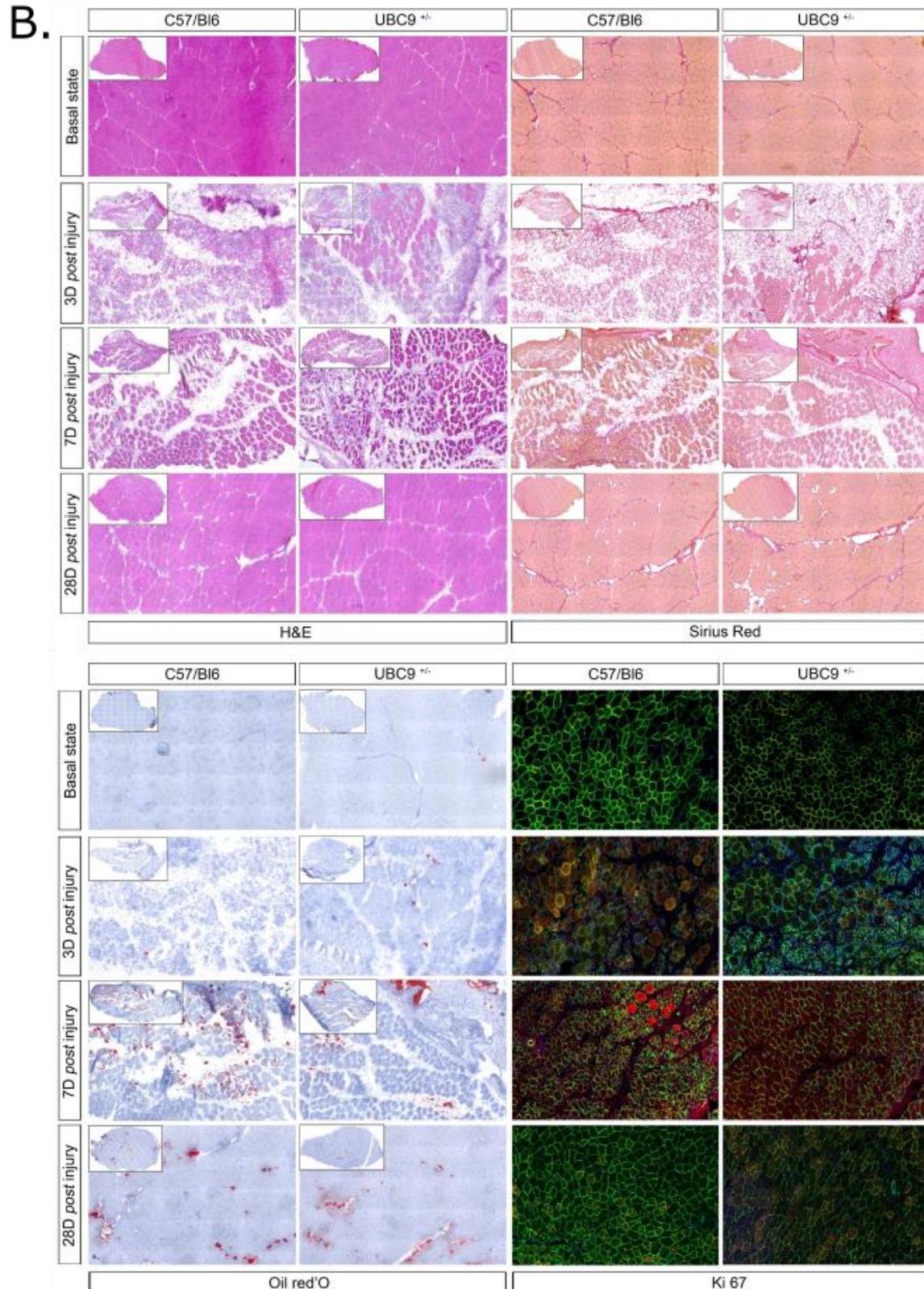
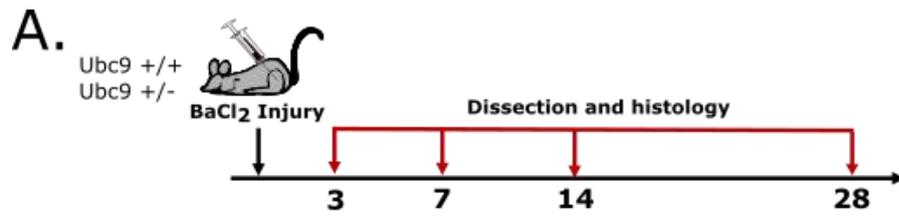
Le marquage Pax7 permet d'identifier les cellules souches satellites et ne révèle pas de différences entre les muscles lésés hétérozygotes pour Ubc9 et les WT, de même que le marquage Ki67 qui marque les cellules en prolifération (**Figure 55B et 55K-N**). En revanche et de manière intéressante, il semble que le niveau basal de cellules satellites soit plus élevé dans les souris Ubc9^{+/-} que dans les Ubc9^{+/+}.

Afin d'examiner l'angiogenèse au cours du processus de régénération, nous avons également réalisé un marquage CD31-laminine qui marque respectivement les vaisseaux sanguins et la lame basale. Trois jours après lésion, le nombre de vaisseaux sanguins par fibres passent de 4 à 2 au niveau des muscles lésés. Le nombre de vaisseaux sanguins est presque revenu à la normale 14 jours après induction de la blessure, et est similaire aux muscles non-lésés à 28 jours. Toutefois, aucune différence n'est à souligner entre les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} (**Figure 55O-R**).

Lors d'une mauvaise régénération ou d'une régénération trop rapide, une accumulation de lipide intramusculaire est observée. Nous avons donc réalisé un marquage Oil Red'o permettant de visualiser les adypocytes afin de vérifier l'état d'infiltration lipidique des muscles lésés (**Figure 55B**). Si les marquages sont similaires aux jours 3, 7, et 28 après lésion, on observe une nette diminution des zones marquées par l'Oil Red'O chez les Ubc9^{+/-} à jours 14 (p=0,0021) (**Figure 55S-T**). Cela signifierait que la régénération chez les individus ayant une perte de moitié de la voie SUMO aurait une meilleure régénération musculaire impliquant moins d'infiltration par les adypocytes.

Ces données révèlent donc des différences subtiles entre les Ubc9^{+/+} et les Ubc9^{+/-} avec moins d'infiltrat adypocytaire à jour 14 et des fibres régénérées plus larges un mois après la lésion chez ces dernières. Ces différences ne suffisent pas pour conclure à une meilleure régénération dans ce modèle, et donc à un rôle clé de SUMO dans le processus de régénération

tissulaire *in vivo*. Toutefois, ces expériences nous permettent de valider notre modèle de lésion aigue musculaire, et les variations observées ainsi que les résultats *in vitro* laissent supposer un phénotype observable dans un modèle où le niveau de SUMOylation serait moins élevé ainsi qu'un rôle physiologique de SUMO dans la myogénèse et la régénération musculaire.



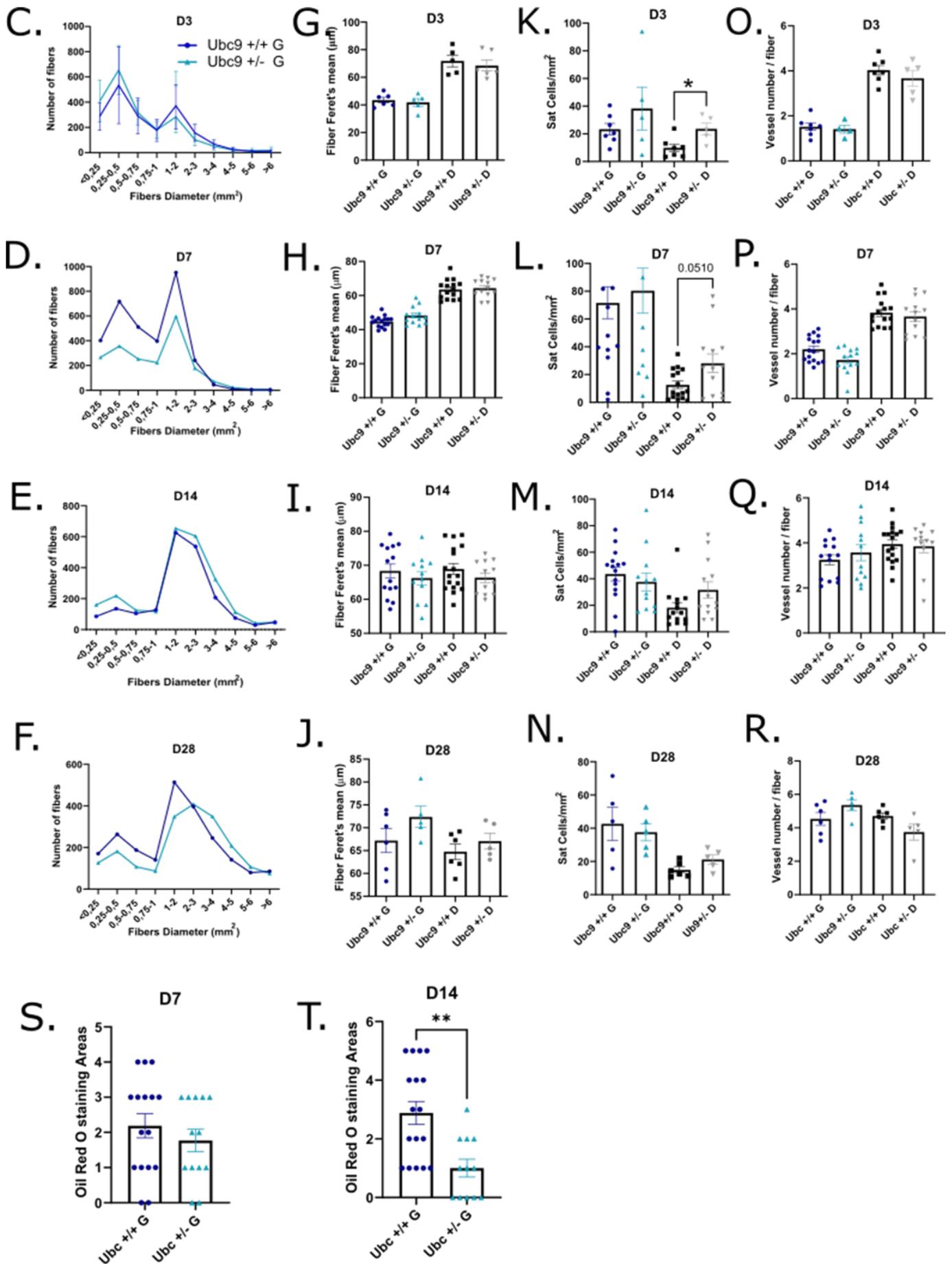


Figure 57 : Régénération musculaire de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} après induction d'une blessure par BaCl₂ au niveau du tibia antérieur.

(A) Schéma du protocole de lésion musculaire. Des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} ont été injectées avec du BaCl₂ au niveau du tibia antérieur gauche afin d'induire une lésion musculaire. Les muscles ont ensuite été disséqués et analysés en histologie 3, 7, 14 et 28 jours après induction de la lésion.

(B) Marquage des cryosections de muscles provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} au stade basal et aux jours 3, 7, 14 et 28 après induction de la lésion (hématoxyline & éosine, rouge sirius, Oil Red'O et Ki67).

(C-F) Distribution du nombre de fibres en fonction de leur diamètre des muscles lésés (G) provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} à 3 (E), 7 (D), 14 (E) et 28 jours (F) après induction de la lésion.

(G-J) Diamètre moyen des fibres des muscles lésés « G » ou non-lésés « D » provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} à 3 (G), 7 (H), 14 (I) et 28 jours (J) après induction de la lésion.

(K-N) Nombre de cellules satellites par mm² au sein des muscles lésés « G » ou non-lésés « D » provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} à 3 (K), 7 (L), 14 (M) et 28 jours (N) après induction de la lésion.

(O-R) Nombre de vaisseau sanguin par fibre au sein des muscles lésés « G » ou non-lésés « D » provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} à 3 (O), 7 (P), 14 (Q) et 28 jours (R) après induction de la lésion.

(S-T) Quantification des adipocytes au sein des muscles lésés « G » provenant des souris Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} à 7 (S) et 14 (T) après induction de la lésion.

Les résultats regroupent deux expériences indépendantes. Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. **p*<0,05 ; ***p*<0,01.

Afin de se tourner vers un système plus physiopathologique de régénération musculaire, des souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} ont été croisées avec des animaux DMD^{mdx-βgeo}, un modèle de dystrophie musculaire de Duchenne dans lequel la dystrophine, le composant majeur de l'architecture des myofibrilles, est absente (Wertz and Füchtbauer, 1998). Ces animaux ont été disséqués et les muscles des tibias antérieurs ont été analysés en immunohistochimie huit semaines après la naissance (**Figure 56A**).

Les mêmes marquages que pour les souris hétérozygotes ont été appliqués. Le marquage hématoxyline & éosine révèle une distribution similaire du nombre de fibres selon le diamètre mais un diamètre moyen de fibres plus élevé chez les souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/-} (*p*= 0,0314) (**Figure 56B-D**). Ce marquage permet également de visualiser les foyers de lésions et révèle des zones lésées plus nombreuses chez les souris dystrophiques WT que chez les hétérozygotes.

On passe ainsi de 58,2 % de zones lésées chez les $DMD^{mdx-\beta geo} Ubc9^{+/+}$ à 50,7% chez les $DMD^{mdx-\beta geo} Ubc9^{+/-}$ ($p=0.0574$) (**Figure 56B et 56F**). De plus, le nombre de vaisseaux sanguins par fibres, indiqué par le marquage CD31-laminine, est plus important chez les souris dystrophique $Ubc9^{+/-}$ que chez les $Ubc9^{+/+}$ (4,4 VS 3,5 ; $p=0,0252$).

Les marquages Pax7 et Ki67 ne montrent pas de différences entre les muscles des deux groupes, la prolifération des cellules souches satellites n'est donc pas impactée (**Figure 56B et 56E**).

Les souris $DMD^{mdx-\beta geo} Ubc9^{+/-}$ présentent donc des muscles moins lésés, avec des fibres plus larges et une meilleure angiogenèse, ce qui indique une meilleure régénération chronique du tissu musculaire. Ce modèle étant plus proche des conditions physiopathologiques observées dans la maladie de Duchenne que celui du modèle de lésion aigue dans des $Ubc9^{+/-}$, nous pourrions par la suite utiliser ce modèle pour étudier le mécanisme par lequel SUMO contrôle négativement le processus de régénération musculaire. La réalisation d'un scRNA-seq des cellules du tibia antérieur de souris $DMD^{mdx-\beta geo} Ubc9^{+/+}$ et $DMD^{mdx-\beta geo} Ubc9^{+/-}$ nous permettrait de mieux comprendre l'impact de SUMO sur les programmes transcriptionnels régulant la myogénèse. De plus, cela nous permettrait de comprendre son action spécifique à chaque type cellulaire et ses conséquences sur leurs interactions. Il serait également intéressant de faire vieillir ces souris et de réitérer ces expériences afin d'obtenir des résultats plus marqués d'une meilleure régénération chez les $Ubc9^{+/-}$, car le phénotype des $DMD^{mdx-\beta geo}$ devient plus visible avec l'âge.

Pour conclure, ces résultats nous confirment donc le rôle régulateur de SUMO dans la myogénèse *in vivo*, et nous offre un excellent modèle pour en étudier les mécanismes associés.

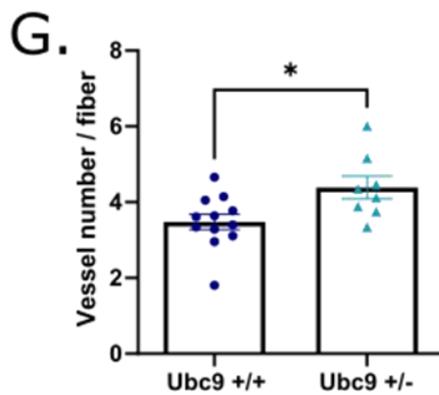
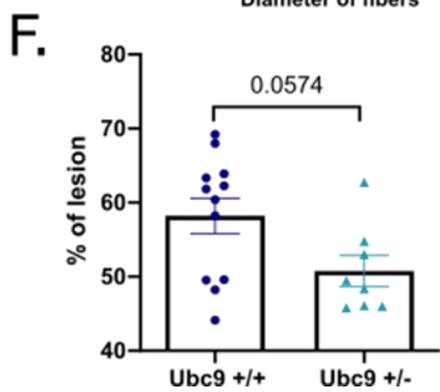
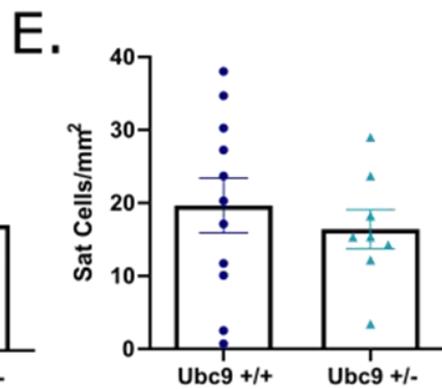
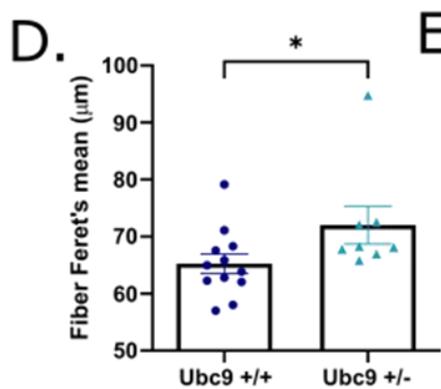
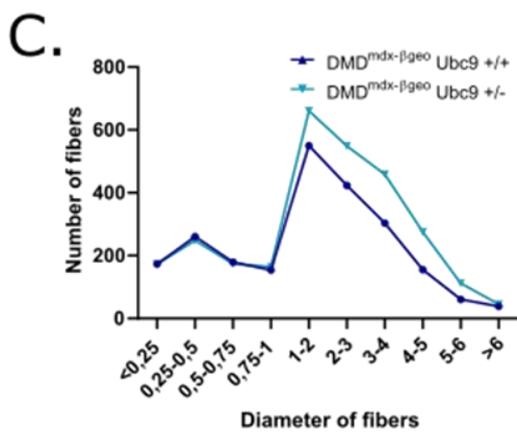
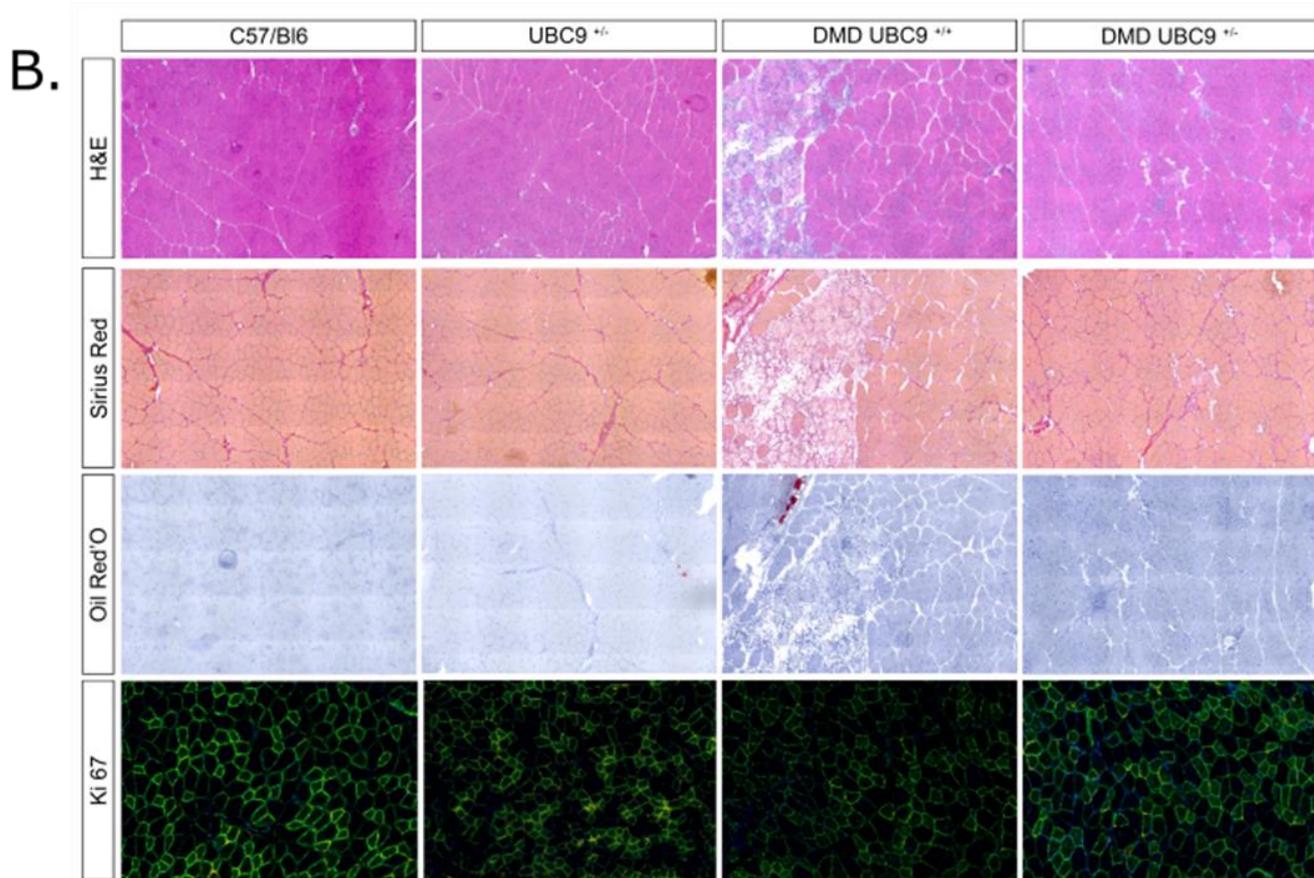
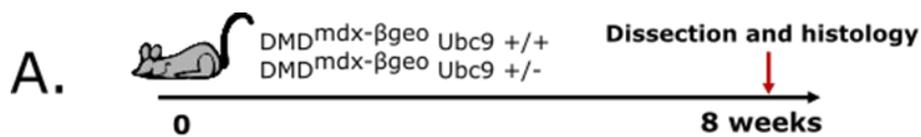


Figure 58 : Meilleure régénération musculaire des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/-}.

(A) Schéma du protocole de régénération musculaire chronique. Les muscles du tibia antérieur des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} ont été disséqués et analysés en histologie 8 semaines après la naissance des animaux.

(B) Marquage des cryosections de muscles provenant des souris Ubc9^{+/+}, Ubc9^{+/-}, DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} (hématoxyline & éosine, rouge sirius, Oil Red'O et Ki67).

(C) Distribution du nombre de fibres en fonction de leur diamètre des muscles provenant des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-}.

(D) Diamètre moyen des fibres des muscles des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-}.

(E) Nombre de cellules satellites par mm² au sein des muscles provenant des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-}.

(F) Pourcentage de lésion des muscles provenant des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-}.

(G) Nombre de vaisseau sanguin par fibre au sein des muscles provenant des souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+}.

Les résultats regroupent deux expériences indépendantes. Les *p-values* ont été calculées à l'aide du test de Mann-Whitney. **p*<0,05.

D. Conclusion

Nous avons donc montré que SUMO régula négativement la prolifération, l'activation et la différenciation des cellules souches satellites *in vitro* ainsi que la régénération musculaire dans un contexte chronique *in vivo*. De plus amples études sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels une hypoSUMOylation favorise la régénération musculaire, mais les données indiquent d'ores et déjà l'implication de plusieurs types cellulaires telles que les cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins et les adypocytes. Nous espérons à terme que ce travail pourrait aider à concevoir de nouveaux protocoles de réparation tissulaire basés sur la manipulation du niveau de SUMOylation, notamment à l'aide de l'inhibiteur mis en place par Takeda et actuellement en essai clinique dans le domaine de l'immunothérapie (Langston et al., 2021). De nouvelles thérapies pourraient alors être mises en place dans des pathologies associées à une mauvaise régénération musculaire telles que les dystrophies musculaires, mais aussi la sarcopénie liée à l'âge ou au cancer.

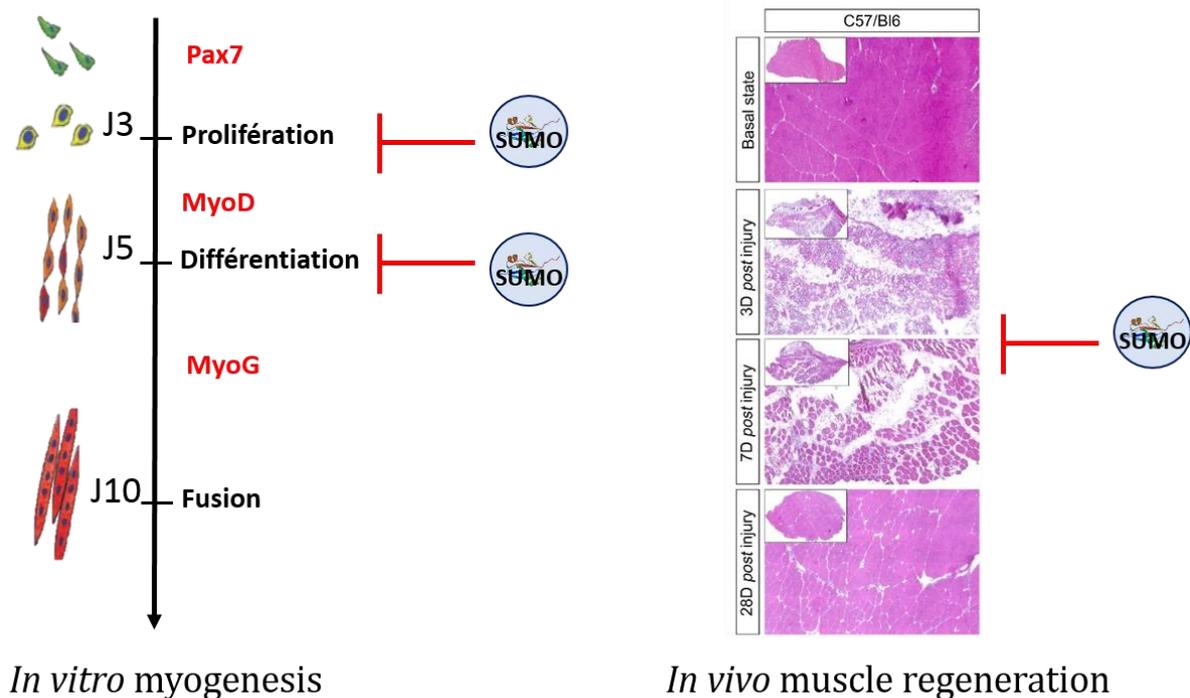


Figure 59 : Schéma récapitulatif de l'action de la voie SUMO sur les étapes de myogenèse *In vitro* et la régénération musculaire *In vivo*.

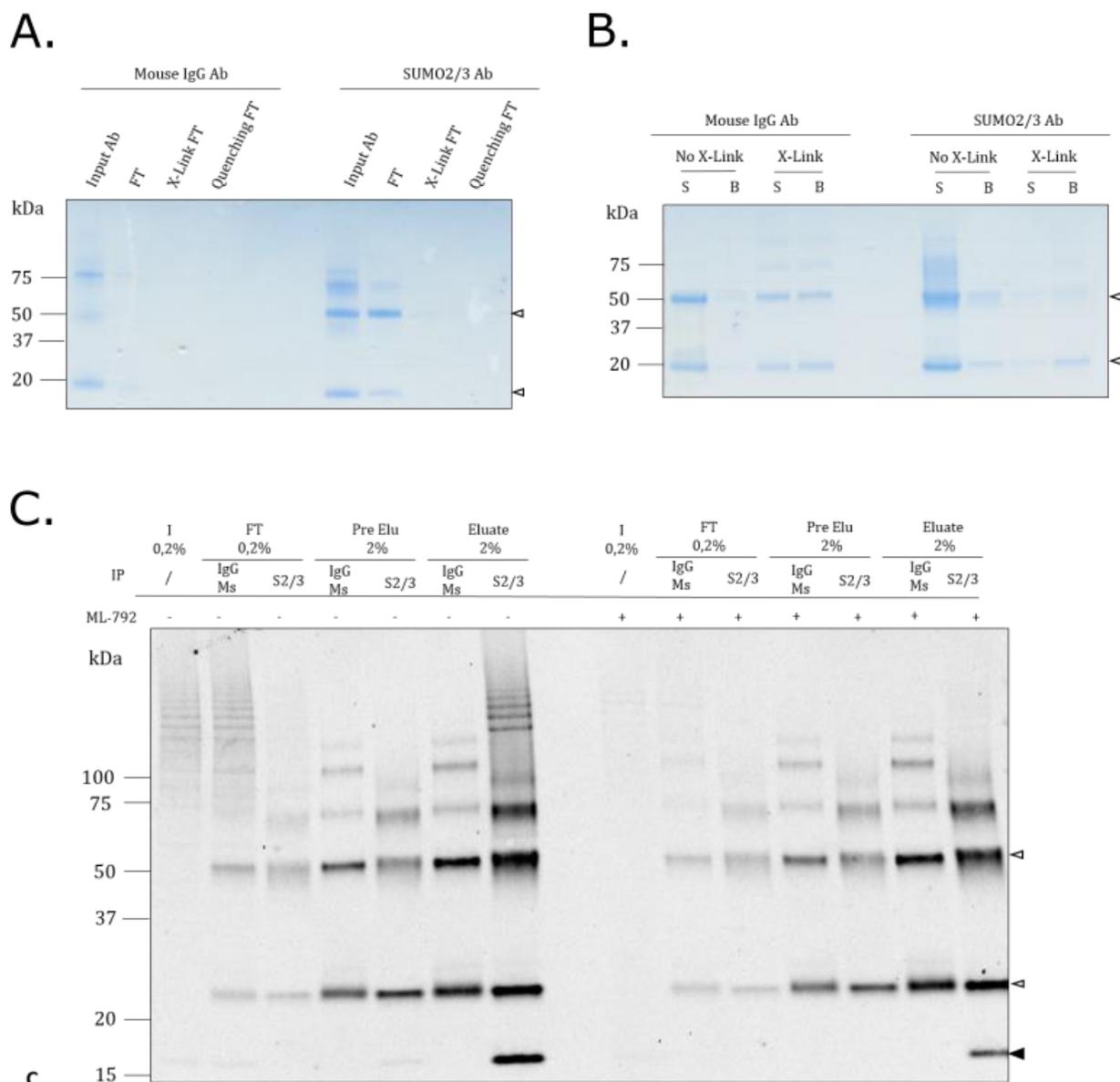


Figure Supplémentaire 1 : Contrôles de l'immunoprécipitation SUMO-2/3 sous stimulation poly(I:C).

(A) Analyse du couplage des anticorps par coloration au bleu de Coomassie. I = *Input*, FT = *flow-through* après incubation avec les billes, X-Link FT = *Flow-through* après l'étape de couplage avec les billes, Quenching FT = *Flow-through* après l'étape de neutralisation de l'agent de couplage.

Le couplage de l'anticorps aux billes se traduit par une plus petite quantité d'anticorps dans le FT que dans l'*input*, et aucune perte dans le X-Link FT et dans le Quenching-FT.

(B) Analyse du couplage des anticorps aux billes par coloration au bleu de Coomassie. Les billes avec (X-Link) ou sans (No X-Link) anticorps ont été incubées dans du tampon SDS 2X à 37°C, puis le surnageant (S) et les billes (B) ont été additionnés de DTT et mis à bouillir. Le couplage de l'anticorps des billes se traduit par une perte d'anticorps dans le surnageant des billes non-couplées mais pas dans le surnageant des billes couplées.

(C) Immunoblot SUMO-2/3 après immunoprécipitation SUMO-2/3. I 0,2% = 0,2% d'*Input*, 0,2% FT 0,2% = 0,2% de *Flow-through* après incubation avec des billes couplées, Pre-Elu 2% = 2% d'échantillon de pré-élution dans les mêmes conditions que l'élution mais sans les peptides, Eluate 2% = 2% d'échantillon après élution peptidique. Une immunoprécipitation réussie se traduit par l'absence de substrats SUMO dans le *Flow-through*, aucune perte dans la pré-élution et un enrichissement en substrats SUMO dans l'échantillon d'éluat.

Les chaînes IgG légères et lourdes sont représentées par les flèches blanches et la bande SUMO libre par la flèche noire.

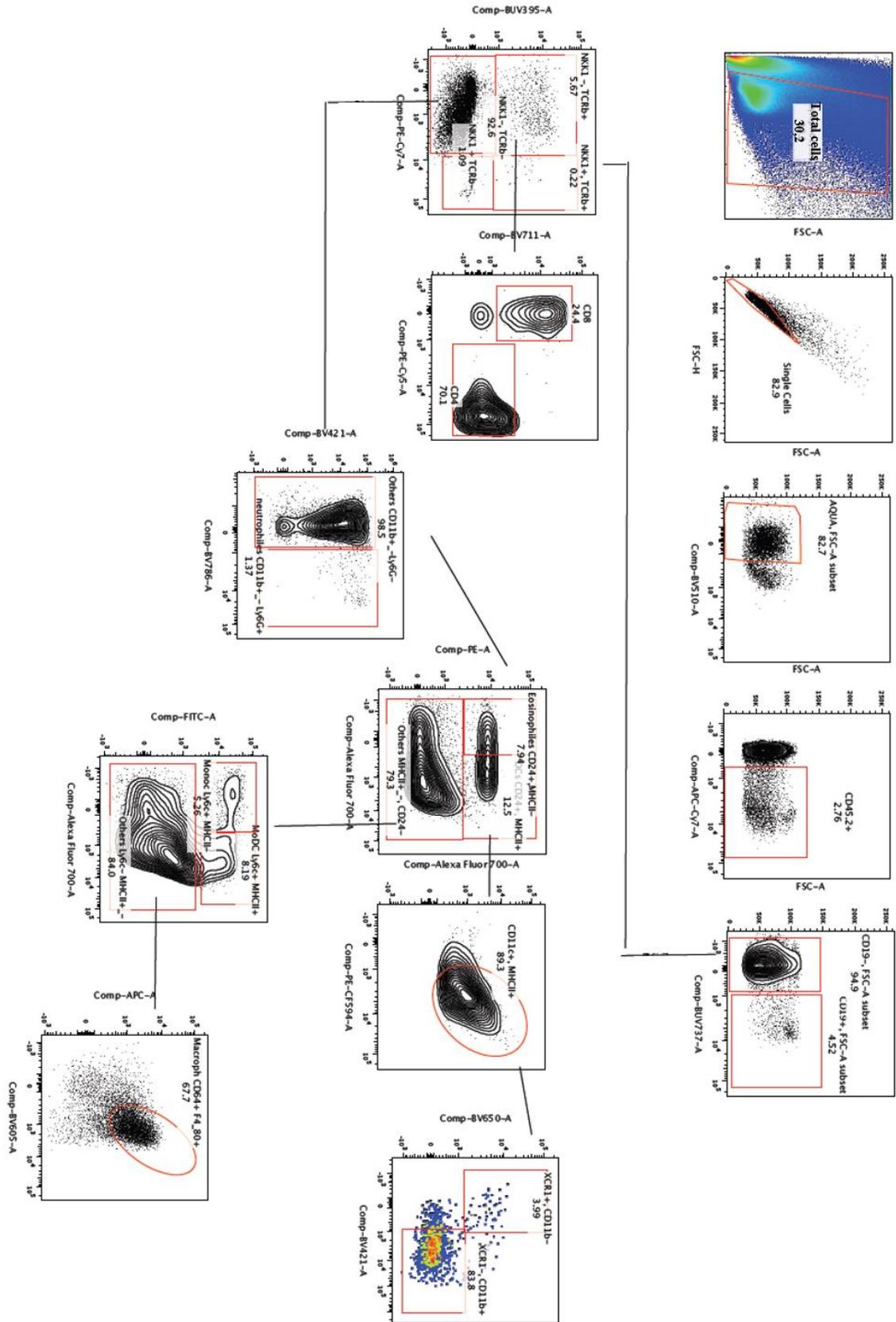


Figure Supplémentaire 2 : Stratégie de FACS utilisée pour définir les principales populations immunitaires.

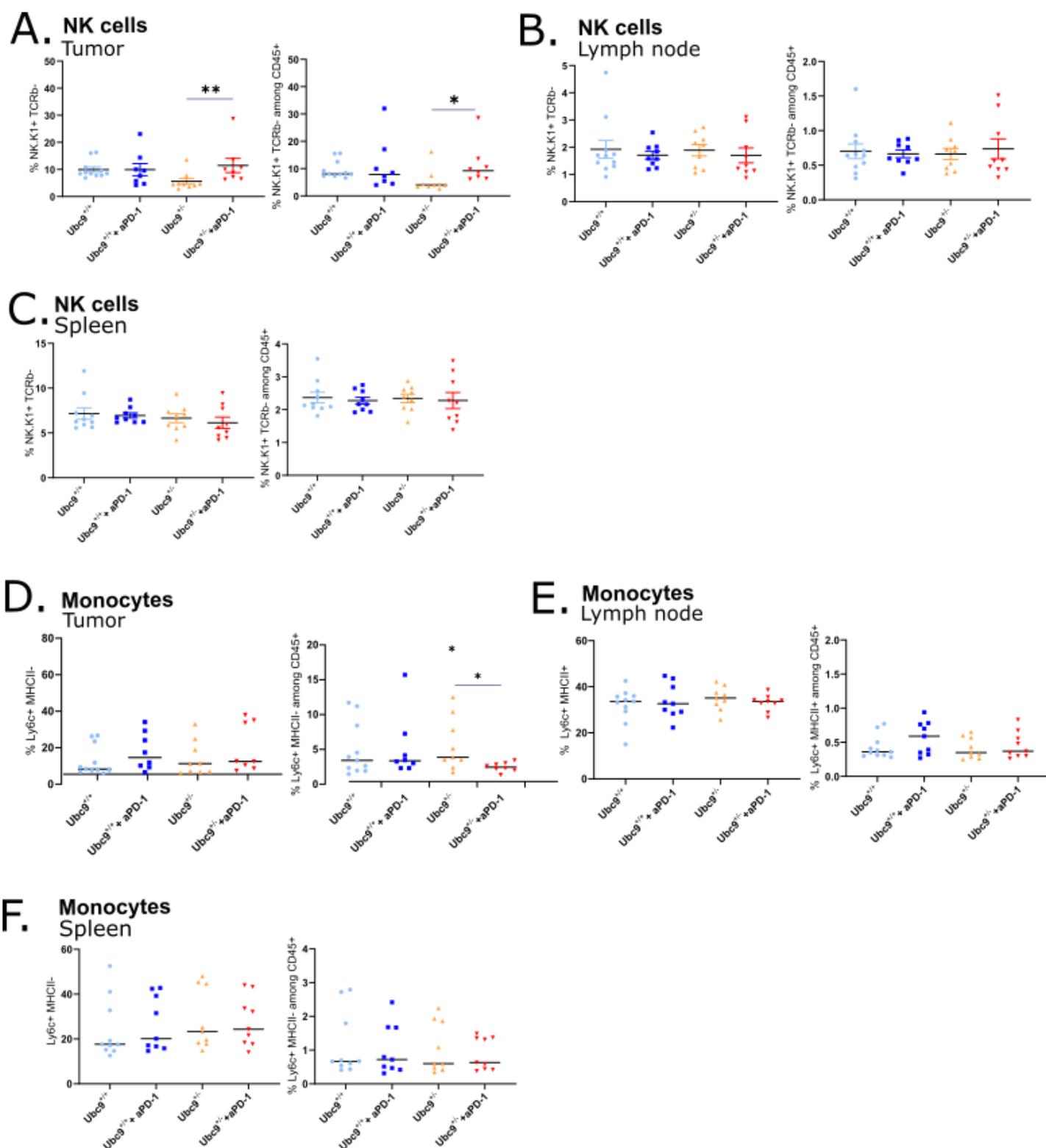


Figure Supplémentaire 3 : Proportion des NK et des monocytes selon les groupes de souris *Ubc9*^{+/+} et *Ubc9*^{-/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A-C) Fréquence (%) des cellules NK1.1⁺TCRb⁻ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des cellules NK1.1⁺TCRb⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA (A), du ganglion lymphatique drainant la tumeur (B) et de la rate (C).

(D-F) Fréquence des cellules $\text{Lya6C}^+\text{MHCII}^-$ parmi les $\text{MHCII}^+\text{CD24}^-$ et des $\text{Lya6C}^+\text{MHCII}^-$ parmi les CD45.2^+ des tumeurs B16F10-OVA (**D**), du ganglion lymphatique drainant la tumeur (**E**) et de la rate (**F**).

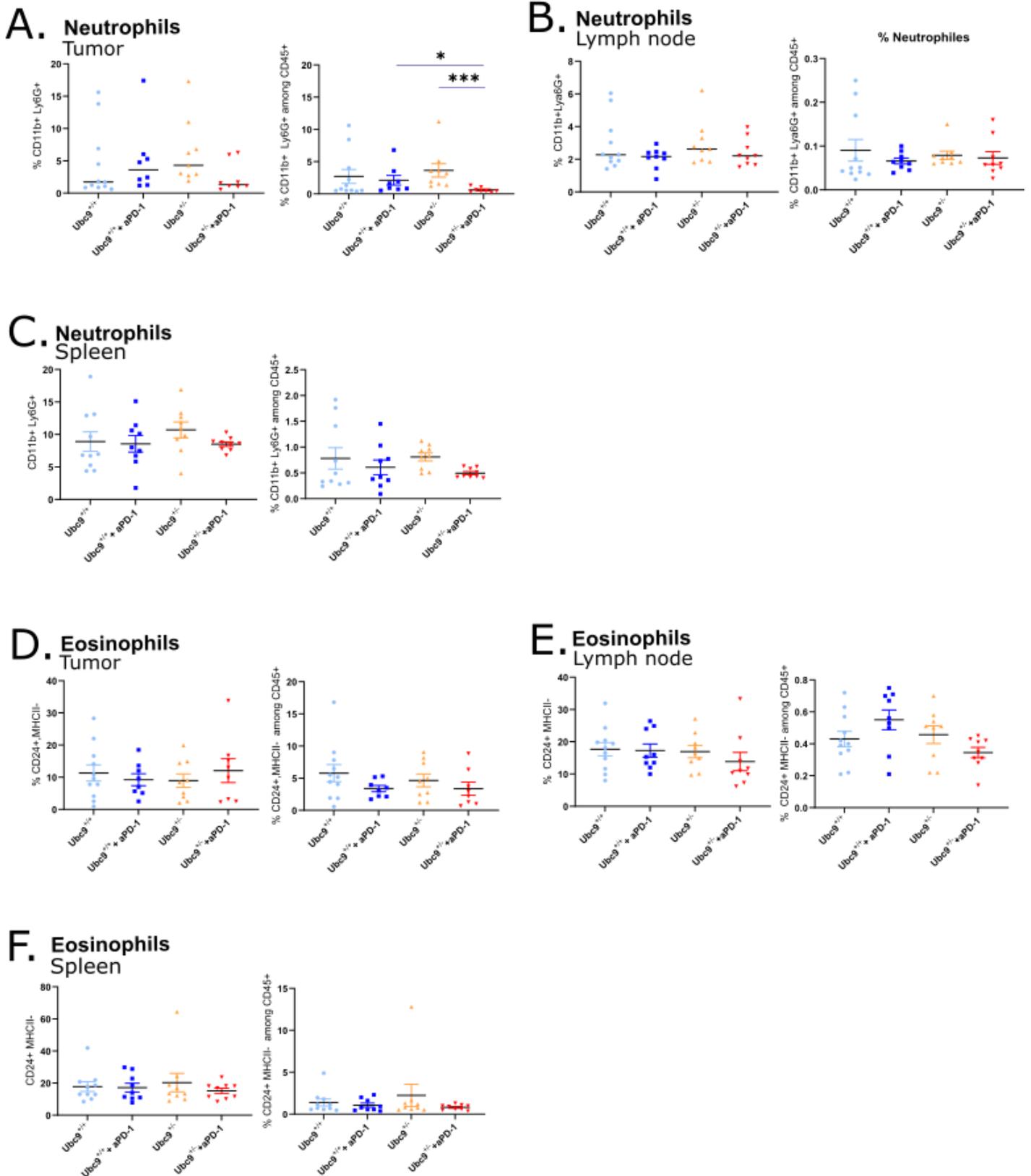
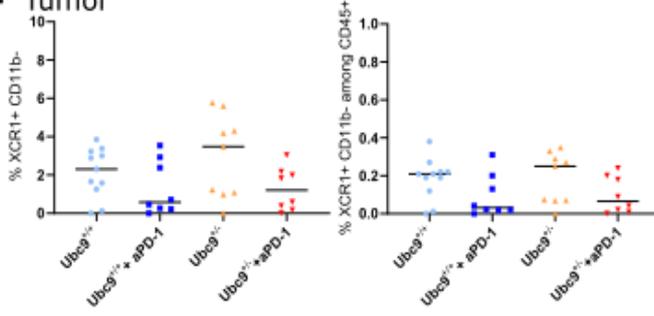


Figure Supplémentaire 4 : Proportion des neutrophiles et des éosinophiles selon les groupes de souris $Ubc9^{+/+}$ et $Ubc9^{+/-}$ traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

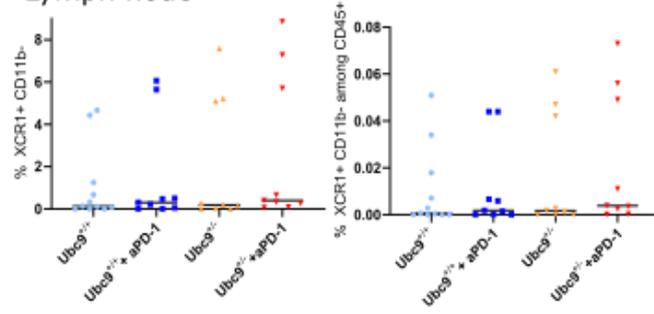
(A-C) Fréquence (%) des cellules $CD11b^{+}Lya6G^{+}$ parmi les $NK1.1^{-}TCRb^{-}$ et des cellules $CD11b^{+}Lya6G^{+}$ parmi les $CD45.2^{+}$ des tumeurs B16F10-OVA **(A)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(B)** et de la rate **(C)**.

(D-F) Fréquence des cellules $CD24^{+}MHCII^{-}$ parmi les $CD11b^{+}Lya6C^{-}$ et des $CD24^{+}MHCII^{-}$ parmi les $CD45.2^{+}$ des tumeurs B16F10-OVA **(D)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(E)** et de la rate **(F)**.

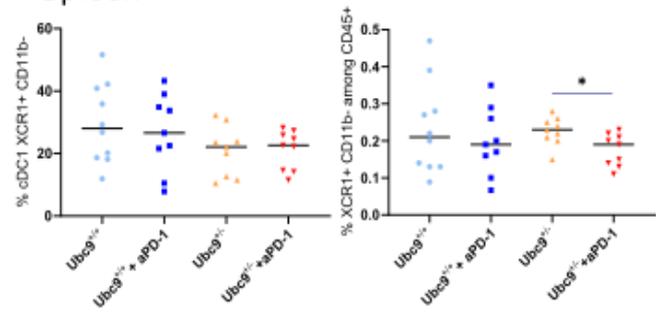
A. cDC1 Tumor



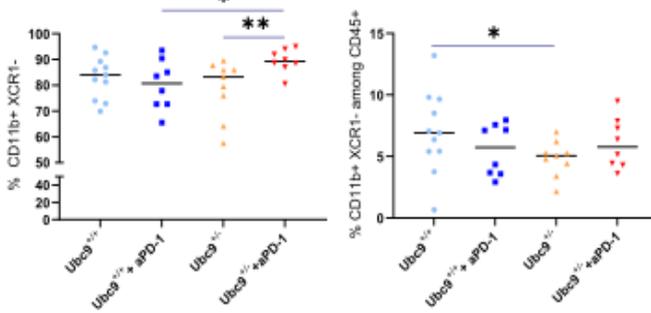
B. cDC1 Lymph node



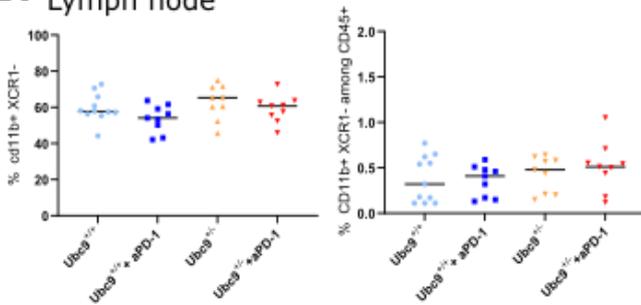
C. cDC1 Spleen



D. cDC2 Tumor



E. cDC2 Lymph node



F. cDC2 Spleen

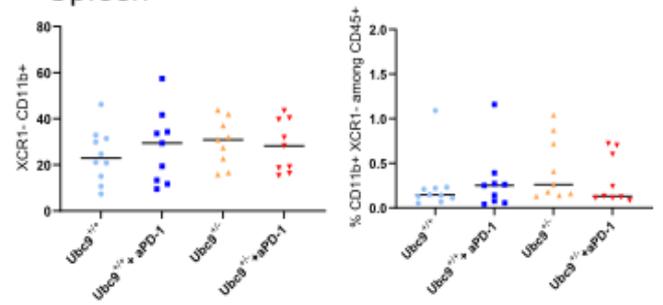


Figure Supplémentaire 5 : Proportion des cDC1 et des cDC2 selon les groupes de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A-C) Fréquence (%) des cellules XCR1⁺CD11b⁺ parmi les CD11c⁻MHCII⁺ et des cellules XCR1⁺CD11b⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA **(A)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(B)** et de la rate **(C)**.

(D-F) Fréquence des cellules CD11b⁺XCR1⁻ parmi les CD11c⁻MHCII⁺ et des CD11b⁺XCR1⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA **(D)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(E)** et de la rate **(F)**.

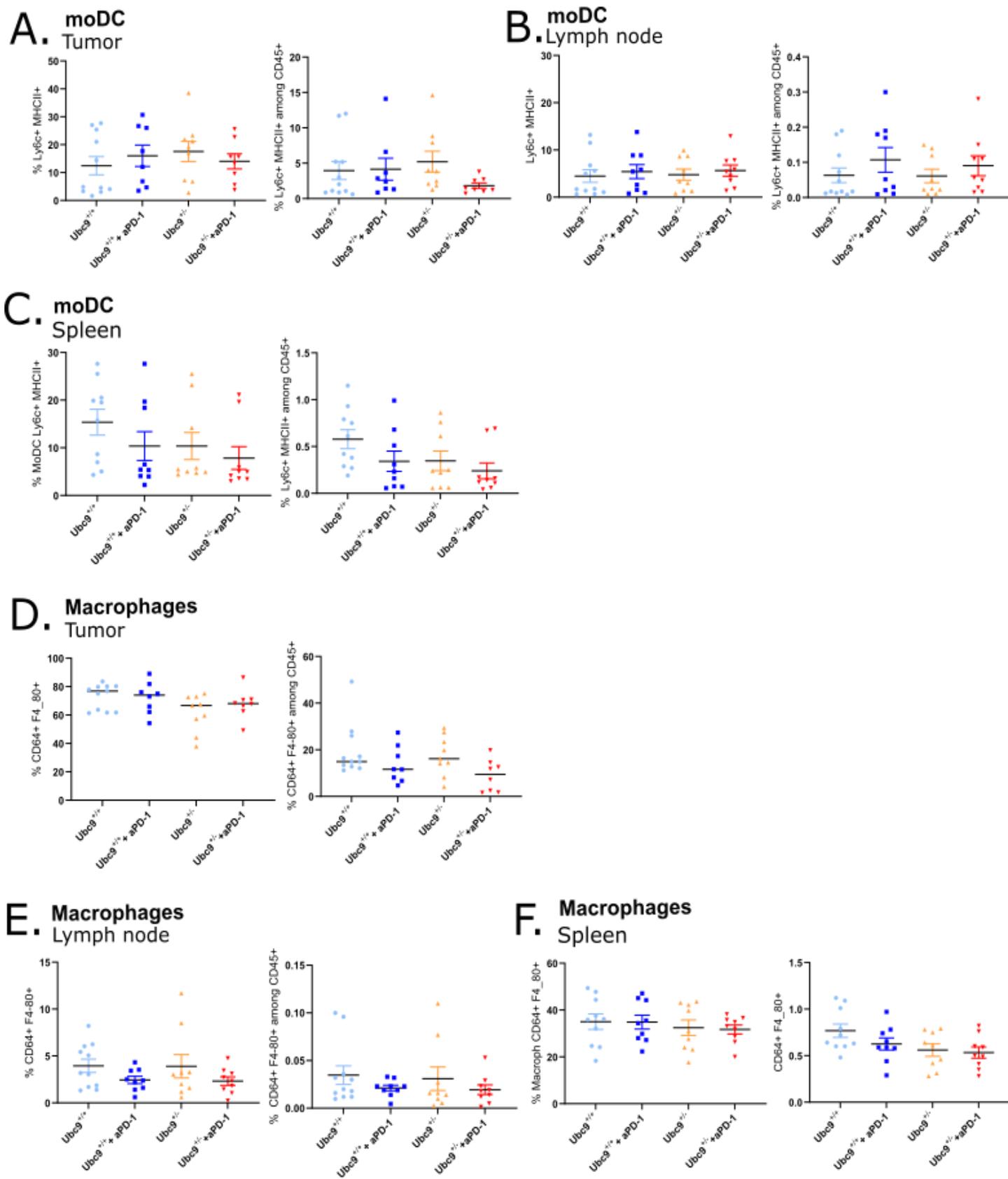


Figure Supplémentaire 6 : Proportion des moDC et des macrophages selon les groupes de souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A-C) Fréquence (%) des cellules Lya6C⁺MHCII⁺ parmi les MHCII⁺CD24⁻ et des cellules Lya6C⁺MHCII⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA **(A)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(B)** et de la rate **(C)**.

(D-F) Fréquence des cellules CD64⁺F480⁺ parmi les Lya6c⁻MHCII⁺ et des CD64⁺F480⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA **(D)**, du ganglion lymphatique drainant la tumeur **(E)** et de la rate **(F)**.

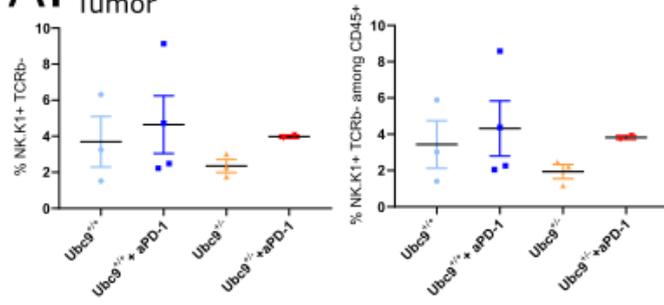
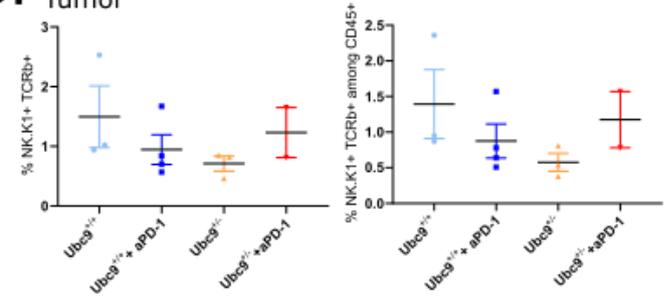
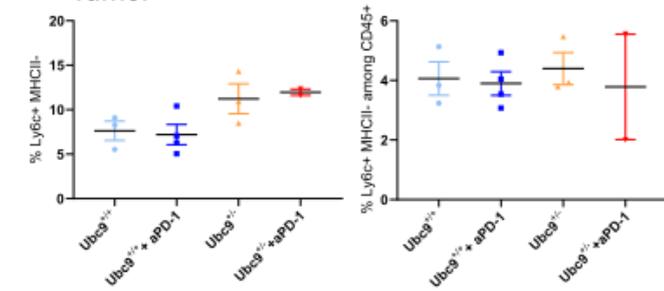
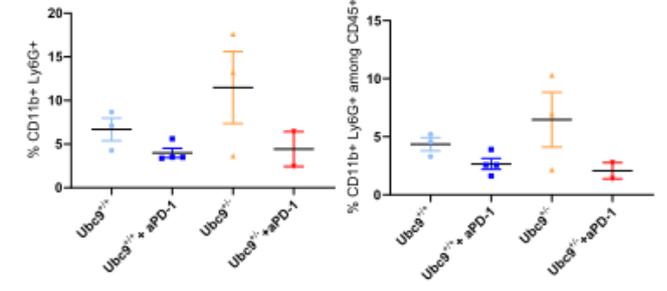
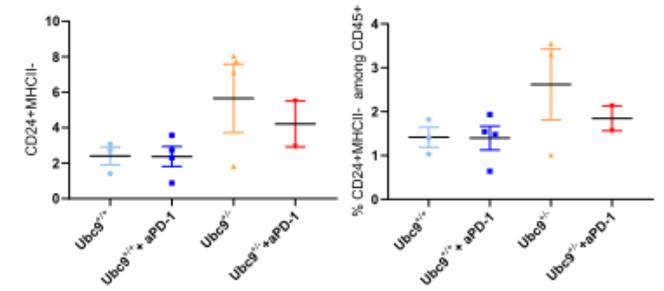
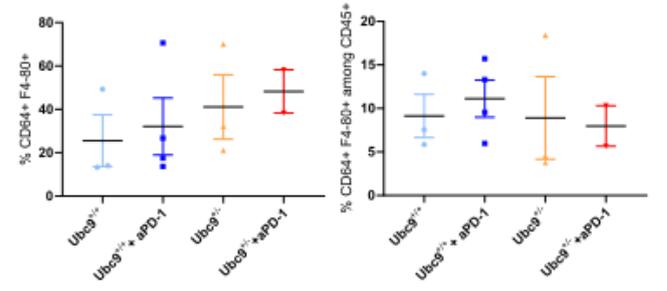
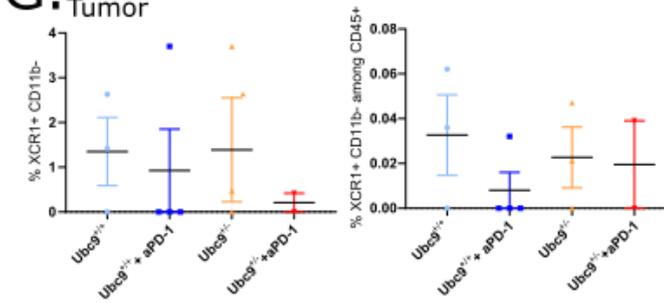
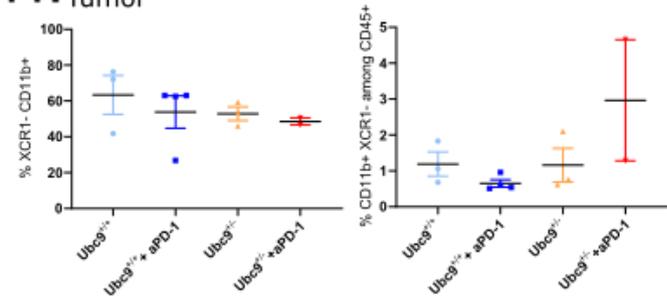
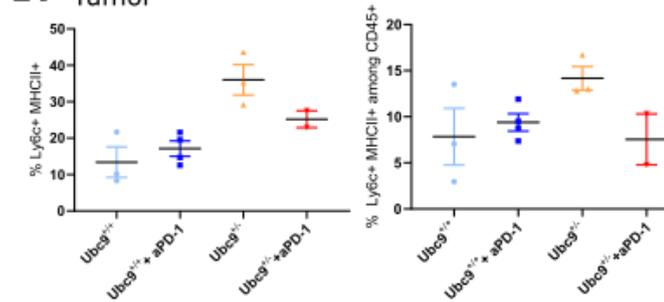
A. NK Tumor**B. NKT Tumor****C. monocytes Tumor****D. Neutrophils Tumor****E. Eosinophils Tumor****F. Macrophages Tumor****G. cDC1 Tumor****H. cDC2 Tumor****I. moDC Tumor**

Figure Supplémentaire 7 : Proportion des NK, des NKT et des populations myéloïdes selon les groupes de souris IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/+} et IFNAR^{-/-} Ubc9^{+/-} traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1.

(A) Fréquence (%) des cellules NK1.1⁺TCRb⁻ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des cellules NK1.1⁺TCRb⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(B) Fréquence (%) des cellules NK1.1⁺TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺CD19⁻ et des cellules NK1.1⁺TCRb⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(C) Fréquence des cellules Lya6C⁺MHCII⁻ parmi les MHCII⁺CD24⁻ et des Lya6C⁺MHCII⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(D) Fréquence (%) des cellules CD11b⁺Lya6G⁺ parmi les NK1.1⁻TCRb⁻ et des cellules CD11b⁺Lya6G⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(E) Fréquence des cellules CD24⁺MHCII⁻ parmi les CD11b⁺Lya6C⁻ et des CD24⁺MHCII⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(F) Fréquence des cellules CD64⁺F480⁺ parmi les Lya6c⁻MHCII⁺ et des CD64⁺F480⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(G) Fréquence (%) des cellules XCR1⁺CD11b⁺ parmi les CD11c⁻MHCII⁺ et des cellules XCR1⁺CD11b⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(H) Fréquence des cellules CD11b⁺XCR1⁻ parmi les CD11c⁺MHCII⁺ et des CD11b⁺XCR1⁻ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

(I) Fréquence (%) des cellules Lya6C⁺MHCII⁺ parmi les MHCII⁺CD24⁻ et des cellules Lya6C⁺MHCII⁺ parmi les CD45.2⁺ des tumeurs B16F10-OVA

Discussion et perspectives

I. Considérations globales

Effet dose et contexte-dépendant de SUMO

Dans notre modèle d'étude *in vitro*, l'hypoSUMOylation induite par l'inhibiteur ML-792 entraîne une réponse IFN-I massive et durable dans la lignée de macrophages Raw264.7, tout comme dans les modèles de BMDCs et BMDMs Ubc9^{-/-} employés par Decque et al. (Decque et al., 2016). Toutefois, alors que leurs expériences de rapporteur Luciférase révèle une augmentation de l'expression du gène *Ifnb1* via l'action de l'*enhancer* situé en -15kb en présence d'un siRNA (« *small interfering RNA* ») dirigé contre Ubc9 comparé au siRNA contrôle, les mêmes expériences réalisées dans des Raw264.7 sous ML-792 montre l'effet inverse. Contrairement à l'effet drastique du ML-792 sur la SUMOylation, le siUbc9 n'entraîne qu'une perte légère de la voie SUMO (Decque et al., 2016). La perte totale de la SUMOylation étant létale pour l'organisme, une perte sévère de cette voie mène à une mortalité accrue des cellules, certainement due une augmentation de l'apoptose et à des défauts mitotiques (Li et al., 2021; Mukhopadhyay and Dasso, 2017). Dans ce contexte, différentes voies de réponse au stress peuvent alors être activées et expliquer la différence de réponse IFN-I observée. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte le contexte dose-dépendant de SUMO à la fois lors de nos expériences et de nos conclusions.

De même, la réponse IFN-I observée dans nos travaux chez les Ubc9^{+/-} *in vivo* ne semble pas aussi massive et évidente que celle provoquée par une hypoSUMOylation plus sévère. Bien que nécessitant une étude plus poussée, il n'apparaît pas de différences majeures de la réponse IFN-I dans les macrophages infiltrant la tumeur des souris Ubc9^{+/-} comparé à ceux des Ubc9^{+/+}, contrairement à ce qu'on observe dans la lignée de macrophages murins ou de cellules primaires de macrophages soumises à une hypoSUMOylation supérieure à 50%.

De plus, nous avons noté chez les animaux Ubc9^{+/-} une augmentation significative du volume tumoral par rapport aux Ubc9^{+/+} en condition non-traitée ce qui signifie qu'une hypoSUMOylation favoriserait la tumorigenèse *in vivo*. Une récente étude réalisée au laboratoire a également montré le rôle suppresseur de tumeur de SUMO dans un modèle de souris Ubc9^{+/-} porteur d'une mutation *Apc* (López et al., 2020). Toutefois, une perte plus sévère de la voie SUMO peut mener à un effet inverse sur le développement tumoral. Ainsi, l'utilisation de ML-792 et TAK-981, des inhibiteurs chimiques spécifiques et puissants de la SUMOylation, mène à une régression tumorale dans des souris ayant un carcinome colorectal

ou un lymphome (Langston et al., 2021). Ces résultats constituent une preuve supplémentaire de l'effet dose-dépendant de SUMO. Dans cet exemple précis, l'effet pro-tumoral de la perte de 50% de la voie SUMO pourrait être dû à l'effet anti-prolifératif de SUMO tel qu'on l'observe *in vitro* avec les cellules souches Pax7⁺ et/ou à son action régulatrice de l'identité cellulaire. Lors d'une perte plus prononcée de la SUMOylation, la toxicité de cette perte pourrait entraîner un arrêt de croissance des cellules tumorales.

De même, ces effets dose et contexte-dépendants sont retrouvés dans la partie régénération musculaire. Ainsi, les souris Ubc9^{+/-} soumises à une lésion musculaire aigüe voient leurs tissus se régénérer de manière très similaire à ceux des Ubc9^{+/+} et ne montrent notamment aucun phénotype remarquable au niveau des cellules souches satellites, tandis qu'un même niveau d'hypoSUMOylation favorise la prolifération et la différenciation des cellules satellites *in vitro*. Cela pourrait s'expliquer par la communication mise en place *in vivo* entre les différents types cellulaires et ne pouvant avoir lieu dans le modèle *in vitro*, ou bien par le fait que certains types cellulaires sont plus sensibles que d'autres à une hypoSUMOylation. Enfin, contrairement au modèle de blessure aigüe, les animaux Ubc9^{+/-} croisés avec des souris DMD^{mdx-βgeo} présentent moins de foyer de lésions que les DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+}, témoignant d'une meilleure régénération musculaire dans un contexte de dégénérescence tissulaire chronique. Le contexte-lésion aigüe ou chronique- est ici décisif sur l'impact de l'hypoSUMOylation.

S'ils n'empêchent pas l'exploitation clinique de la voie SUMO, ces effets dose et contexte-dépendants de SUMO, bien connus de ceux qui l'étudie, doivent en revanche indispensablement être pris en compte lors de ses applications thérapeutiques.

II. SUMO et immunité

A. SUMOylome

Les substrats responsables de la régulation directe de l'*Ifnb1* seraient-ils spécifiques à SUMO-1 ?

Les cibles SUMOylées identifiées par les SUMOylomes endogènes de macrophages murins sont exclusivement des substrats de SUMO-2/3 car cette technique repose sur la reconnaissance par un anticorps d'un épitope spécifique à cet isoforme. Certaines protéines,

telles qu'Egr1, peuvent être à la fois modifiées par SUMO-1 et SUMO-2/3, mais certains substrats sont spécifiques d'un isoforme de SUMO. Or, si les trois isoformes de SUMO sont présents en -15, -21 et -28kb du gène *Ifnb1*, c'est surtout SUMO-1 qui disparaît de ces régions sous stimulation LPS, en particulier en -15kb, ce qui serait en faveur d'un rôle majoritaire des substrats de SUMO-1 sur cette région (Decque et al., 2016). Toutefois, une étude réalisée par Stetson et al. souligne le rôle majoritaire de l'isoforme SUMO-2/3 sur cette réponse, et insiste sur l'insuffisance de SUMO-1 pour la répression de l'*Ifnb1* (Crowl and Stetson, 2018). Bien que nos SUMOylomes nous aient fourni des pistes intéressantes sur un potentiel mécanisme de régulation de l'*Ifnb1* par certains substrats hyperSUMOylés par SUMO-2/3 sous stimulation, et que ces pistes nécessitent d'être explorées, il est important de garder en tête que ce mécanisme pourrait vraisemblablement passer par des cibles exclusives de SUMO-1. Notre étude nous permettra donc peut-être de trancher en faveur d'une des deux hypothèses, ou du moins d'apporter des éléments de réponse supplémentaires sur la régulation de cette région par SUMO.

Tout comme le révèle les expériences de Decque *et al.* et comme le confirme nos résultats, l'amplification de cette réponse implique en revanche les trois isoformes de SUMO, mais majoritairement SUMO-2/3. Etant donné le *pool* bien plus important de SUMO-2/3 et l'action spécifique de cet isoforme par rapport à SUMO-1 au niveau des gènes de la réponse IFN-I lors d'expériences de réactivation virale, il est fort probable que les cibles SUMO-1 ne jouent pas un rôle majeur dans l'amplification de la réponse IFN-I (Chang et al., 2013).

La SUMOylation induit-elle une activité de répresseur actif à Maff ?

Maff fait partie des protéines hyperSUMOylées dans les Raw264.7 stimulées avec du LPS ou du poly(I:C). Sa présence dans la région en -15kb de l'*Ifnb1* et son relargage lors de stimulations croissantes avec du LPS en fait un candidat idéal pour l'étude de la régulation de ce gène par SUMO-2/3 (Garber et al., 2012). Avant notre étude, la SUMOylation de Maff n'avait encore jamais été documentée dans la littérature, mais un autre membre de la famille MAF, nommé MafG, a été montré comme SUMOylé sous sa forme homodimérique (Motohashi et al., 2006). Sous sa forme d'hétérodimère, il agit en tant qu'activateur de la transcription grâce au domaine effecteur de son partenaire p45, tandis qu'il possède une activité répressive passive sous sa forme d'homodimère *via* le recrutement d'histones déacétylases. Sous l'effet de la SUMOylation, un complexe répresseur est recruté à la chromatine et l'activité répressive de MafG devient active. A la lumière de ces résultats, nous avons donc supposé que la

SUMOylation de Maff sous sa forme d'homodimère favoriserait son activité répresseur. Lors d'une stimulation pathogène, le complexe répresseur Maff serait alors relargué de la chromatine, conduisant à une réponse interféron de type I. S'en suit deux hypothèses, soit sous hypoSUMOylation le répresseur homodimère de Maff serait relargué encore plus rapidement de la chromatine, voir disparaîtrait totalement, et ceci même dans des conditions non stimulées, soit il serait remplacé par le complexe hétérodimère de Maff qui serait alors activateur. Dans le premier cas, le relargage de Maff entraînerait une levée de la répression génique et une conformation « ouverte » de la chromatine, dans le second cas la transcription de l'*Ifnb1* serait activée par le complexe hétérodimère de Maff. Les expériences de ChiP-seq Maff ne permettant pas de discerner les formes homo- ou hétérodimère de Maff, il faudrait pour cela réaliser des ChiP-seq des partenaires de Maff et comparer leur profil, ou effectuer un *pull-down* d'une sonde ADN portant l'ensemble du gène *Ifnb1* ainsi que la région en -15kb suivit d'un Western-blot de Maff et de ses partenaires.

Régulation par sumo des « *immediate early-genes* » ?

Plusieurs substrats hyperSUMOylés sous stimulation LPS ou poly(I:C) correspondent à des protéines de réponse précoces provenant des « *immediate early-genes* » (IEGs). En réponse à des signaux extra-ou intracellulaires, ces gènes sont transcrits en quelques minutes sans nécessiter de synthèse protéique *de novo* (Bahrami and Drabløs, 2016). Les IEGs ont des rôles importants dans diverses fonctions cellulaires telles que l'immunité et la plasticité neuronale et interviennent également dans certaines pathologies telles que le cancer. Selon le signal, différents ensembles d'IEGs sont activés. Les produits des principaux IEGs de réponse à une stimulation des TLRs (Egr1, FOS, JunB) sont retrouvés hyperSUMOylés dans nos SUMOylomes sous LPS et poly(I:C). Cette observation soulève la question du rôle de SUMO dans la régulation de l'expression de ces protéines de réponse précoce. Ces protéines sont-elles hyperSUMOylées parce qu'elles sont surexprimées dans un délai très court et sont donc présentes en abondance, ou bien la SUMOylation de ces protéines régulerait-elle leur expression ou leur activité, comme c'est le cas pour le complexe c-Fos/c-Jun et comme cela a déjà été prouvé pour JunB (Garaude et al., 2008; Tempé et al., 2014)? Dans tous les cas, la SUMOylation augmente au moins proportionnellement à l'expression de ces protéines, ce qui démontre un rôle important de la fraction SUMOylée de ces substrats dans la réponse immunitaire innée. Cette observation est d'autant plus remarquable que nos SUMOylome n'ont

révélé qu'un faible nombre de substrats hyperSUMOylés sous LPS alors que de nombreuses protéines sont surexprimées dans ce contexte.

Au-delà de ces trois substrats, on peut se demander si la SUMOylation jouerait un rôle dans la régulation d'autres ensembles d'IEGs répondant à divers signaux, au niveau protéique, comme révélé par le SUMOylome, mais aussi au niveau de la transcription de ces gènes. Plusieurs éléments penchent en faveur de cette hypothèse. Par exemple, il a déjà été prouvé que la voie SUMO intervenait dans la régulation des protéines « *immediate early* » de différents virus (Adamson and Kenney, 2001; Chen et al., 2013). De plus, les IEGs présentent des structures chromatinienne particulières qui favorisent leur transcription, telles qu'un enrichissement de la marque H3K9me3. Or, une étude réalisée au laboratoire a démontré que la délétion de SUMO dans les cellules souches embryonnaires entraînait une perte de l'hétérochromatine dépendante d'H3K9me3 à l'échelle du génome (Cossec et al., 2018). De même, les recherches ontologiques que nous avons effectuées sur les protéines hypoSUMOylées sous LPS révèlent leur implication dans l'organisation chromatinienne, or, la régulation des IEGs fait intervenir des complexes de remodelage de la chromatine et des protéines chromatinienne. La régulation de la transcription des IEGs par SUMO pourrait ainsi expliquer en partie son rôle majeur dans la régulation de programmes transcriptionnels globaux et dans la réponse à de nombreux signaux intra- et extracellulaires (Neyret-Kahn et al., 2013).

Sumo entraînerait-elle une mémoire épigénétique de l'immunité ?

Parmi les substrats hypoSUMOylés sous LPS se trouvent plusieurs membres du complexe Ep400/Tip60, connu entre autres pour son rôle de remodelage de la chromatine *via* le remplacement d'histones canoniques par des variants non-canoniques tels qu'H2AZ et H3.3 (Pradhan et al., 2016). Nos expériences de ChiP-seq ont révélé la présence de ces variants au niveau de la région -15kb de l'*Ifnb1*, d'ISGs et de gènes de la réponse inflammatoire. Sous hypoSUMOylation, de même que sous stimulations pathogéniques, aucune variation remarquable d'H2AZ et d'H3.3 n'était visible au -15kb, ce qui indique que le complexe Ep400/Tip60 n'est pas impliqué dans la régulation directe de l'*Ifnb1*. Toutefois, sous hypoSUMOylation, H2AZ disparaît au niveau de nombreux ISGs tandis qu'H3.3 augmente au niveau de certains ISGs tels que *Mx2*. La même dynamique est observée au niveau de certains gènes inflammatoires. Le dépôt d'H3.3 et le retrait d'H2AZ étant associés à une élévation de la transcription des ISGs, nous avons supposé que l'hypoSUMOylation du complexe

Ep400/Tip60 étant responsable de l'amplification de la réponse IFN-I (Au-Yeung and Horvath, 2018; Tamura et al., 2009). Il semble également que ce phénomène soit impliqué dans la durabilité de la réponse. En effet, le dépôt d'H3.3 est conservé longtemps après la transcription du gène, ce qui pourrait expliquer l'expression durable des gènes sur lesquels ce variant est déposé (Tamura et al., 2009). De plus, H3.3 a été démontré comme impliqué dans la mémoire épigénétique, et plus récemment dans la mémoire épigénétique immunitaire (Kamada et al., 2018; Ng and Gurdon, 2008). L'acquisition de l'histone H3.3 et de la marque chromatiniennne H3K36me3 entraînerait un recrutement accéléré de l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription au niveau de certains ISGs dits « *memory* » sous stimulation par IFN- β ou d'INF- γ . Cette mémoire épigénétique confère aux gènes une transcription amplifiée et accélérée lors d'une stimulation. Bien qu'H2AZ n'ait pas été directement démontré comme prenant part à cette mémoire transcriptionnelle immunitaire, il a également été montré comme participant à la mémoire épigénétique transcriptionnel chez la levure (Brickner et al., 2007). La SUMOylation étant un processus dynamique et très rapide, une hypoSUMOylation entraînerait la transcription directe du gène *Ifnb1* par un mécanisme encore peu clair, et activerait le complexe Ep400/Tip60 qui viendrait déposer H3.3 sur certains ISGs. L'accumulation d'H3.3 favoriserait une conformation plus ouverte de la chromatine et la transcription des gènes en serait favorisée, amplifiant la réponse IFN-I. Dans l'étude de Kamada et al., les gènes « *nonmemory* » sont déjà marqués par l'histone H3.3 avant stimulation mais ne voient pas d'augmentation de cette histone sous stimulation. C'est également ce qu'on observe sous hypoSUMOylation sur certains gènes tels que *Isg15* et *Irf1*, ce-dernier étant d'ailleurs désigné comme un gène « *nonmemory* » par Kamada et al.. En revanche, sur certains gènes désignés comme « *memory* » tels que *Mx2*, nous observons un gain et une distribution plus étalée d'H3.3 sous hypoSUMOylation, ce qui conforterait l'hypothèse d'une structure chromatiniennne plus ouverte et d'une mémoire transcriptionnelle régulée par la SUMOylation. On pourrait également étendre cette hypothèse à certains gènes de réponse à la voie Nf- κ b, ce qui expliquerait pourquoi l'étude de Decque et al. ne révélait un recrutement de SUMO-1 et SUMO-2/3 qu'à un faible nombre de gènes inflammatoires, et pourquoi, en l'absence de SUMO, la réponse inflammatoire est dépendante d'IFNAR. En effet, dans ce contexte de mémoire transcriptionnelle épigénétique de l'immunité, l'induction de la transcription des gènes a lieu après stimulation par IFN. De même, la perte d'H2AZ aux promoteurs des ISGs, qu'on suppose dû au complexe Ep400/Tip60 hypoSUMOylé, est induite par l'IFN (Au-Yeung and Horvath, 2018). En présence de SUMO, il n'y aurait pas de « *priming* » de ces gènes, les réponses IFN-I et inflammatoire se

déclencheraient grâce aux mécanismes classiques et la réponse à la voie Nf- κ b ne nécessiterait donc pas la présence d'IFNAR.

B. SUMO et immunité anti-tumorale

Effet d'addiction non-oncogénique de SUMO ?

Dans notre étude, une perte de 50% de la SUMOylation favorisait la croissance tumorale, tandis que cette même perte couplée à un traitement anti-tumoral provoquait de forts effets anti-tumoraux. De même, plusieurs études ont montré que SUMO était nécessaire pour la survie cellulaire lorsque ces cellules présentaient des anomalies telles que l'activation d'un oncogène. Ainsi, il a été démontré que la transformation cellulaire KRAS-dépendante nécessite la voie SUMO, de même que la prolifération des cellules tumorales exprimant MYC (Hoellein et al., 2014; Kessler et al., 2012; Yu et al., 2015). Dans ce dernier exemple, la perte de la SUMOylation conduit à une catastrophe mitotique et à la mort cellulaire en altérant un programme transcriptionnel dépendant de Myc qui permettait le maintien d'une mitose correcte. On peut donc proposer ici le concept d'« addiction non-oncogénique » pour expliquer la dépendance des cellules cancéreuses à la voie SUMO (Luo et al., 2009; Nagel et al., 2016). Ainsi, lors d'une forte signalisation oncogène telle qu'une activité élevée de Myc ou Ras ou encore sous un traitement anti-tumoral tel que l'anti-PD-1, la voie SUMO devient indispensable à la survie des cellules cancéreuses. Il semble que sous une forte dose d'inhibiteur de la voie SUMO, cet effet d'addiction non-oncogénique de la voie SUMO est également applicable (Langston et al., 2021). Ces observations font de SUMO un candidat attrayant pour des thérapies anti-cancéreuses, car une perte modérée de la SUMOylation dans certains contextes (cellules cancéreuses présentant une activation de Myc, ou patients sous traitements anti-PD-1 par exemple) va spécifiquement être toxique pour les cellules transformées sans avoir d'effets nocifs sur les cellules saines, ce qui n'est pas forcément le cas lorsque l'on cible directement les oncogènes activés. Etant donné le rôle régulateur de SUMO dans la prolifération et la plasticité cellulaire et ses effets dose-dépendants, entre autres, il est toutefois nécessaire d'effectuer des études de toxicités secondaires et de réaliser des tests de dosage. De plus, il serait intéressant de réaliser un criblé sur des cellules transformées Ubc9^{+/-} ou Ubc9^{+/+} afin d'identifier les partenaires létaux synthétiques de la voie SUMO. La molécule inhibitrice de la SUMOylation, TAK-981, étant déjà impliquée dans des études cliniques, cela nous permettrait

d'identifier les patients les plus susceptibles de répondre à la thérapie par hypoSUMOylation selon le profil mutationnel de leur(s) tumeur(s) (Assouline et al., 2019).

La SUMOylation induit-elle une modification du phénotype des cellules immunitaires ?

Nos expériences de FACS et de scRNA-seq dans le cadre du rôle anti-tumoral de SUMO *in vivo* ont révélé une infiltration plus importante de cellules immunitaires dans la tumeur ainsi qu'une modification des proportions des différents effecteurs de l'immunité. Il est important de souligner que, tout comme pour la population des lymphocytes T CD8, les cellules peuvent également subir des changements de leur phénotype. Ainsi, même sans modification notable de leur proportion, ces populations pourraient jouer un rôle essentiel dans l'action anti-tumorale médiée par l'hypoSUMOylation. Cela pourrait expliquer pourquoi les populations myéloïdes participent à la réponse anti-tumorale sans que l'on observe de modifications majeures de leur proportion dans notre modèle. Les données du scRNA-seq pourront dans un premier temps nous aider à caractériser nos populations et à regarder si leur transcriptome est modifié selon leur génotype et leur traitement. Nous pourrions ensuite réaliser des études phénotypiques plus approfondies, telles que de la cytométrie pour regarder l'expression des récepteurs activateurs ou inhibiteurs chez les NK. Des études fonctionnelles telles que des expériences de dosages cytokiniques ou de lyse de cellules cibles seraient également nécessaires pour voir si l'activité de nos différents effecteurs est renforcée sous hypoSUMOylation couplée à un traitement anti-PD-1.

Modèles tumoraux plus physiologiques pour l'étude de SUMO

Notre étude a mis en avant le rôle majeur de la SUMOylation dans la régulation de l'immunité anti-tumorale. A la lumière de ces résultats, il serait intéressant d'employer des modèles murins plus aptes à étudier la voie SUMO de la même manière que l'on étudierait la mise en place d'un nouveau traitement contre le cancer. Dans un premier temps, afin de mieux appréhender l'action de la SUMOylation directement sur les cellules B16F10, il serait intéressant d'induire une hypoSUMOylation de ces cellules et de les injecter dans des souris WT. Ainsi, nous pourrions voir si nous retrouvons l'effet pro-tumoral observé chez nos animaux *Ubc9^{+/-}* non-traités, ou si cet effet était dû au fait que la tumeur elle-même n'était pas hypoSUMOylée. De plus, il a été montré que l'injection d'IFN-I directement au site tumoral couplé à un traitement par blocage de point de contrôle était plus efficace qu'une injection systémique car l'expression des IFN-I était souvent inhibé au sein de la tumeur (Liang et al.,

2018). Cela pourrait expliquer pourquoi la réponse IFN-I ne semble pas jouer un rôle aussi primordial que ce que l'on observe dans un contexte d'infection pathogénique. Une hypoSUMOylation directe de la tumeur nous permettrait donc peut-être d'obtenir des effets anti-tumoraux encore plus drastiques et de mieux comprendre le rôle anti-tumoral des IFN-I médié par la voie SUMO. De plus, ce modèle nous permettrait d'étudier la communication entre les cellules tumorales et les cellules de l'hôte. Il serait également intéressant d'employer en parallèle la molécule d'inhibition chimique de la SUMOylation, TAK-981, que nous sommes actuellement en train de tester chez nos souris, afin de développer un modèle murin pré-clinique. Une inhibition chimique nous permettrait en effet de réaliser certaines études impossibles à mettre en place dans nos modèles génétiques, telles qu'un test de traitement néoadjuvant d'hypoSUMOylation couplé à un anti-PD-1/PD-L1. En effet, de nombreuses études soulignent l'importance de l'ordre d'administration des traitements. Notamment, les immunothérapies sont souvent plus efficaces lorsqu'elles sont administrées avant la résection de la tumeur chez le patient (Amaria et al., 2018; Blank et al., 2018; Liu et al., 2016). A terme, le but serait de mettre en place un modèle préclinique de souris recevant le même traitement que les patients (incluant la chirurgie du cancer, l'immunothérapie, la radiothérapie, la chimiothérapie) en combinaison d'inhibiteur de SUMO afin de définir quelles seraient les meilleures stratégies à adopter. Ce type de modèle permettrait également l'étude d'autres cancers, dont des modèles métastatiques.

C. Sumo, rétroposons, immunité innée et anti-tumorale

SUMO régulerait-il la réponse immune innée et anti-tumorale *via* la répression des rétroposons ?

En étudiant les données de ChiP-seq H3.3, nous avons observé une corrélation entre la position de cette histone à la chromatine et la présence de rétrotransposons, en particulier les RLTR45 qui font partie des rétroéléments « *long terminal repeat* » (LTR). En effet, 50% des pics H3.3 perdus sous ML-792 se situent sur des régions de rétrotransposons (données non-montrées). La perte de ce variant ayant déjà été liée avec une activation de l'expression de rétrotransposons dans les cellules ES, nous avons voulu vérifier par RT-qPCR si une hypoSUMOylation menait à une augmentation du niveau d'ARN de ces rétroéléments (Elsässer et al., 2015). Nos données préliminaires indiquent que l'expression des RLTR45 est

effectivement favorisée sous ML-792, et que cette augmentation est encore plus importante sous stimulation avec du poly(I:C) (**Figure 57**). Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle répresseur de la SUMOylation sur l'expression des RLTR45, répression médiée par le dépôt d'H3.3. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Cossec et al. dans les cellules ES qui révèle une forte association de SUMO avec des rétrotransposons LTR et la marque d'hétérochromatine H3K9me3 (Cossec et al., 2018).

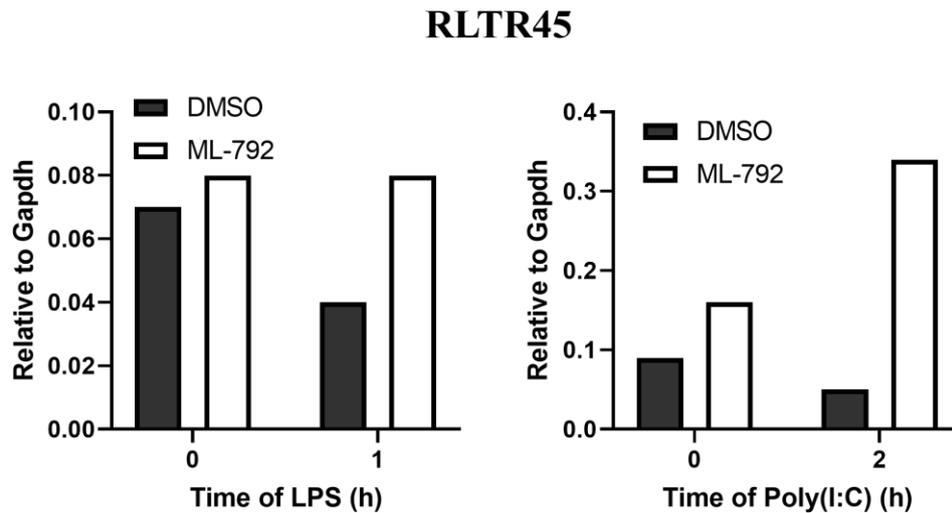


Figure 60 : Augmentation du niveau d'expression des RLTR45 sous ML-792.

Quantification du niveau d'expression des RLTR45 par RT-qPCR sans stimulation ou sous 1h de LPS ou 2h de poly(I:C), avec ou sans ajout de ML-792.

Les rétroéléments ont une structure similaire aux acides nucléiques viraux, et sont donc reconnus par les mêmes voies moléculaires que celles impliquées dans la réponse anti-virale (Gázquez-Gutiérrez et al., 2021). Par conséquent, une expression aberrante des rétrotransposons pourrait activer la voie principale de réponse anti-virale, c'est-à-dire la voie IFN-I, et prendre part à la réponse massive d'IFN-I observée sous hypoSUMOylation.

Ce rôle répresseur de SUMO sur les rétroéléments pourrait donc également être étudié et exploité dans un contexte anti-tumoral. Récemment, Griffin et al. ont réalisé un crible sur des régulateurs épigénétiques à l'aide de Crispr-Cas9 dans des tumeurs B16 de mélanome et ont, entre autres, identifié *Setdb1* comme médiateur de l'échappement immunitaire (Griffin et al., 2021). *Setdb1*, de même que SUMO, est enrichi à la chromatine au niveau de certains rétrotransposons et un KO *Setdb1* entraîne le réveil de ces rétrotransposons *via* la diminution de la marque H3K9me3, ce qui corrèle avec nos données et celles de Cossec *et al.*. Ces rétroéléments sont

ensuite traduits et les peptides sont reconnus et pris en charge par le complexe d'histocompatibilité de classe I comme des antigènes viraux, puis présentés à la surface des cellules tumorales. Les cellules immunitaires vont donc reconnaître les peptides étrangers et détruire la tumeur *via* une réponse cytotoxique T spécifique aux rétroéléments. A la lumière de ces résultats, nous supposons donc qu'une hypoSUMOylation des cellules de mélanomes de manière génétique ou chimique va entraîner les mêmes effets que le KO *Setdb1* et mener à une importante réponse anti-tumorale. Par ailleurs, les rétroéléments pourraient également ne pas être traduits et déclencher la voie IFN-I par reconnaissance de l'ARN double-brin. D'un point de vue plus clinique, ces données soulèvent la question d'un traitement localisé à la tumeur plutôt que systémique dans le cas de tumeurs non-métastasées, qui serait moins nocif pour l'organisme et potentiellement plus efficace. Les modèles pré-cliniques que nous aimerions mettre en place permettraient notamment de répondre à ce type d'interrogations.

III. SUMO et régénération musculaire

Une hypoSUMOylation affecterait-il le mode de division des cellules souches satellites ?

Dans nos expériences de différenciation *in vitro*, une hypoSUMOylation menait à une prolifération, une activation et une différenciation accrue des cellules souches satellites et à plus de cellules Pax7⁺ chez les souris non-lésées, tandis qu'aucune différence au niveau de ces cellules n'était observable *in vivo* entre les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} lésées. Si le nombre et la localisation des cellules satellites sont similaires dans nos modèles, qu'en est-il de leur phénotype ? En effet, les cellules souches musculaires se divisent de manière asymétrique afin de donner lieu à des cellules activées, précurseurs des myoblastes, tout en restaurant le stock de cellules souches satellites (Kuang et al., 2007). Les cellules Pax7 observées sont-elles plutôt souches (Pax7^{high}/Myf5⁻) ou précurseurs de myoblastes (Pax7^{low}/Myf5⁺) ? De plus, une étude récente a rapporté que les cellules satellites pouvaient passer d'un mode de division asymétrique à symétrique *in vitro* et que cela semble faire intervenir les variants d'histones H3.1 et H3.3 (Evano et al., 2020). Une hypoSUMOylation affecterait-il le mode de division des cellules souches satellites ? Ainsi en condition physiologique *in vivo*, on pourrait envisager qu'une hypoSUMOylation favoriserait un mode de division symétrique en faveur d'un renouvellement des cellules souches satellites, ou du moins perturberait la balance des divisions asymétriques, ce qui entraînerait un nombre accru de cellules Pax7⁺, ce qui serait également le cas lors des

trois premiers jours de différenciation *in vitro*. Toutefois, en situation de stress, la balance serait rétablie ou ces cellules originalement souches seraient converties en précurseurs ou encore la balance serait en faveur de l'accumulation des précurseurs, ce qui, selon le contexte, favoriserait une meilleure myogenèse. Afin de répondre à ces questions, nous envisageons dans un premier temps de réaliser un FACS sur les cellules musculaires de souris Tg:Pax7-nGFP Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} et de caractériser les cellules satellites selon leur niveau d'expression de Pax7. Par la suite, nous souhaitons effectuer un scRNA-seq des muscles de souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+} ou Ubc9^{+/-} afin d'obtenir les profils d'expression des différentes cellules, et définir un ratio des cellules Pax7⁺ souches ou précurseurs selon le génotype de la souris.

SUMO agirait-il sur la structure des fibres ?

Nos études *in vivo* nous ont permis de mettre en avant une meilleure régénération musculaire chez les souris DMD^{mdx-βgeo} hypoSUMOylées avec notamment moins de foyer de lésion et des fibres plus larges. Dans ce modèle murin de dystrophie, il a été montré que les fibres étaient plus « branchées » que les souris non-dystrophiques du fait de leur régénération constante, ce qui les rendrait plus fragiles (Pichavant and Pavlath, 2014). Nos souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/-} présenteraient-elles des fibres moins branchées par rapport aux DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/+}? Une étude de Nayak et al. montre l'implication de SUMO dans l'organisation des sarcomères, ou plus exactement la nécessité de SENP3, une déSUMOylase pour la bonne formation de ces structures (Nayak et al., 2019). Ainsi, une baisse globale de la SUMOylation se met en place progressivement à mesure que les myoblastes se différencient en myotubes, tandis que la dégradation de SENP3 lors du phénomène de cachexie mène à des structures sarcomériques désorganisées. Une hypoSUMOylation semble donc nécessaire à la bonne structure des sarcomères, et on peut supposer que nos souris DMD^{mdx-βgeo} Ubc9^{+/-} présentent des fibres mieux organisées et moins branchées que les souris contrôles. Afin de vérifier cela, nous envisageons de réaliser des coupes longitudinales des muscles de ces souris et d'observer le branchage des fibres.

Quel est l'impact de la SUMOylation sur la sénescence dans un contexte de régénération musculaire ?

Une autre piste potentielle à explorer est l'impact de la voie SUMO sur le processus de sénescence cellulaire associé à la régénération musculaire. Cet état est caractérisé par un arrêt de la prolifération cellulaire et induit la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines, altérant ainsi le microenvironnement tissulaire. La sénescence joue un rôle primordial dans le remodelage tissulaire, notamment lors du développement, de la reprogrammation et de la régénération musculaire (Chiche et al., 2017; Demaria et al., 2014; Le Roux et al., 2015). Or, il a été démontré qu'une hypoSUMOylation globale obtenue par la déplétion d'UBC9 entraînait un arrêt de croissance ressemblant à un état de sénescence dans des lignées de fibroblastes humains primaires (Neyret-Kahn et al., 2013). Toutefois, la sénescence peut également être nocive pour la réparation des tissus, comme le met en avant une étude réalisée dans un modèle de rat DMD (Sugihara et al., 2020). Une hyperSUMOylation pouvant favoriser un phénotype ressemblant à de la sénescence dans des fibroblastes lors de la surexpression de SUMO-2 ou la répression de SENP1, SENP2 ou SENP7, il serait intéressant d'étudier les effets de la voie SUMO sur la sénescence dans nos modèles *in vivo* (Li et al., 2006; Yates et al., 2008). Un lien entre la voie SUMO et la myogenèse a déjà été établie, il a notamment été démontré que l'accumulation de SUMO ligases favorisait la sarcopénie et les dystrophies musculaires par la sénescence prématurée des cellules satellites (Kudryashova et al., 2012). Il semble donc qu'une régulation fine du phénomène de sénescence soit nécessaire afin de permettre le bon déroulement de la régénération des fibres musculaires. Une modification de la SUMOylation dans un sens ou dans l'autre semble perturber ce processus et selon le contexte, être favorable ou non à une meilleure réparation des tissus. C'est pourquoi nous envisageons d'évaluer le processus de sénescence au niveau des muscles du tibia antérieur de nos différents modèles murins en colorant les cellules avec du SA- β Gal, un marqueur bien établi de la sénescence et en analysant l'expression de différents marqueurs de sénescence, tels que p16INK4a, p21 ainsi que l'IL-6 et MMP-3, des facteurs sécrétés lors de ce processus.

Rôle régulateur de SUMO dans l'immunité et impact sur la régénération musculaire

Etant donné le rôle de SUMO dans la régulation de l'immunité, et l'importance des populations immunitaires dans le processus de régénération musculaire, il est étonnant qu'une hypoSUMOylation ne modifie pas l'infiltration ou l'action des cellules immunitaires lors de la

régénération musculaire. Les colorations F4/80, un marqueur macrophagique, que nous avons réalisé dans nos différents modèles *in vivo* ne démontrent aucune différence entre les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} (données non-montrées). Toutefois, ce marquage ne nous permet que de notifier de la présence ou non de macrophages, et ne nous permet pas de caractériser leur phénotype ou leur fonction. Par exemple, les macrophages présentent un profil M1 lors des premières phases de régénération puis se convertissent en macrophages M2, favorisant la croissance cellulaire et la réparation tissulaire, mais le marquage F4/80 ne les distingue pas. Une analyse par scRNA-seq des cellules totales des muscles nous permettrait dans un premier temps de regarder leur profil d'expression et de caractériser plus précisément leur phénotype. De plus, cette analyse nous permettrait d'étudier les autres effecteurs de l'immunité impliqués dans la réparation des tissus, tels que les neutrophiles ou les cellules T. Nous pourrions également analyser les profils cytokiniques *in vitro* des cellules immunitaires lors d'expériences de co-culture avec des cellules musculaires.

IV. SUMO et hyperinflammation

SUMO jouerait-il un rôle dans l'équilibre pro et anti-destruction tissulaire *via* son action sur les leucocytes

Dans un contexte de lésion musculaire aiguë, aucune différence de régénération musculaire majeure n'est observée entre les souris Ubc9^{+/+} et Ubc9^{+/-} tandis que des lésions chroniques entraînent une meilleure régénération chez les +/- par rapport aux +/+. Il semble donc que l'environnement lésionnel continu et l'hyperinflammation associée favorisent la réparation du muscle chez les Ubc9^{+/-}. De la même manière, la présence d'une tumeur constitue un foyer d'hyperinflammation qui pourrait être comparé à celui du modèle de blessure chronique employé dans notre étude. Les souris Ubc9^{+/-} traitées avec de l'anti-PD-1 présentaient une activation des lymphocytes effecteurs et un recrutement diminué des macrophages M2 pro-tumoraux en faveur des macrophages M1. Ces deux types cellulaires jouant un rôle important dans l'inflammation, que ce soit au niveau d'un site tumoral ou d'une lésion musculaire, on pourrait imaginer que l'action antagoniste de la SUMOylation dans ces deux contextes proviennent en partie de son impact sur ces populations (Gajewski et al., 2013; Novak et al., 2014; Zhang et al., 2014). Ainsi dans un contexte d'hyperinflammation, l'hypoSUMOylation faciliterait d'un côté la reconstruction tissulaire et de l'autre l'activité anti-

tumorale, donc de destruction du tissu, en favorisant dans les deux cas la maturation des lymphocytes et des macrophages. Il existerait donc un équilibre subtil entre pro- et anti-destruction tissulaire médié, du moins en partie, par le processus de SUMOylation. Il serait intéressant d'étudier le rôle de SUMO dans des pathologies où le processus de reconnaissance du soi est altéré et entraîne la destruction tissulaire telles que les maladies auto-immunes.

Conclusion

Ce projet de thèse a permis de mettre en avant le rôle majeur de la voie SUMO dans la régulation de l'immunité innée et anti-tumorale. Plus précisément, nos données ont montré qu'une hypoSUMOylation couplée à un traitement anti-PD-1 entraîne une importante réponse anti-tumorale mettant en jeu à la fois les population myéloïdes et lymphoïdes, et impliquant au moins en partie la voie interféron de type I.

Nous avons également réalisé des SUMOylomes qui nous ont permis de définir de nouveaux substrats de SUMO-2/3 dans un contexte infectieux. L'étude des cibles dynamiques de SUMO sous stimulations pathogéniques a révélé plusieurs candidats potentiels pour la régulation de l'*Ifnb1* et une explication à l'amplification de la réponse IFN-I et à la réponse inflammatoire *via* la déposition du variant H3.3 et le relargage d'H2AZ au niveau d'ISGs et de gènes inflammatoires par le complexe Ep400/Tip60.

De plus, nous avons pu mettre en évidence la régulation négative par la voie SUMO de la prolifération, l'activation et la différenciation des cellules souches satellites *in vitro* ainsi que de la régénération musculaire dans un contexte chronique *in vivo*.

Nous espérons que ces études permettent l'identification de nouvelles stratégies pour manipuler la SUMOylation à des fins thérapeutiques contre le cancer et les pathologies associées à une mauvaise régénération musculaire, telles que les dystrophies musculaires ou la sarcopénie.

Matériel & Méthodes

Immunothérapie

Souris

Toutes les procédures de cette étude ont été approuvées par le comité de protection et d'utilisation des animaux de l'Institut Pasteur (2018-0010) et par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. Des animaux âgés de 6 à 12 semaines ont été utilisés dans cette étude et hébergés sous un cycle lumière/obscurité de 12/12h dans une installation exempte d'agents pathogènes à température et humidité contrôlées. La nourriture et les boissons étaient données à volonté. Les expériences ont été menées sur des souris C57BL/6J (Janvier Labs, France) ou sur des souris génétiquement modifiées croisées avec des souris ayant un fond C57BL/6J. Les *Ubc9^{+/-}*, les *Ifnar1^{-/-}*, les *LyzM-Cre* ont été décrites précédemment (Clausen et al., 1999; Nacerddine et al., 2005; Schilte et al., 2010).

Culture Cellulaire

La lignée cellulaire B16F10-OVA (aimablement fournie par l'équipe d'Amigorena S., Institut Curie, Paris) a été cultivée à 37°C et 5% de CO₂ dans un milieu de culture complet (*Dulbecco's Modified Eagle's Milieu* (DMEM)) complété avec 10% de FBS + pénicilline et streptomycine.

Progression tumorale *in vivo* et immunothérapie

500 000 cellules de mélanome B16F10 exprimant OVA (B16-OVA) ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit des souris. Les animaux ont ensuite été assignés au hasard à un groupe contrôle recevant du PBS ou à un groupe recevant le traitement anti-PD-1. L'anticorps anti-PD-1 (clone RMP1-14, BioXcell) a été administré par voie intrapéritonéale à une concentration de 150 µg/20g aux jours 7, 11, 15 et 19. Le volume de la tumeur a été déterminé à chaque injection d'anti-PD-1 à l'aide d'un pied à coulisse.

Elispot

Un prélèvement sanguin a été réalisé 13 jours après l'implantation de la tumeur. 1.5×10^5 cellules/puits ont été ajoutées à des plaques auparavant recouvertes d'un anticorps monoclonal anti-IFN- γ primaire (BD biosciences, 551309) en présence ou absence d'antigènes peptidiques OVA afin de stimuler la sécrétion d'IFN- γ (SIINFEKL et ISQAVHAAHAEINEAGR). Les plaques ont été incubées une nuit à 37°C dans un milieu RPMI (GIBCO) complété avec du

2-mercaptoéthanol, de la pénicilline et streptomycine, du L-Glutamine (LifeTechnologies), et 10% de FBS. Les plaques ont ensuite été rincées puis les échantillons ont été incubés avec un anticorps anti-IFN- γ conjugué à la biotine (Mabtech) puis soumis à une deuxième incubation avec de la streptavidine-phosphatase alcaline (Mabtech). Les substrats ont ensuite été révélés grâce au kit *AP Conjugate Substrate* (Biorad). Les points ont été comptés avec un système de lecture CTL S6 *Analyzer*.

Dissociation des tissus et cytométrie en flux

Le ganglion lymphatique drainant la tumeur ainsi que la rate et la tumeur ont été prélevés au jour 20 après l'implantation de la tumeur. Les tissus ont été digérés dans 1 (ganglion) ou 2 ml (rate et tumeur) de milieu *CO2 Independent* (GIBCO) contenant 0,1mg/ml de DNase I et 0,1mg/ml de Liberase TL (Roche), à 37°C pendant 30 min sous agitation. Les échantillons de tumeur et de rate ont ensuite été filtrés à l'aide de tamis cellulaires de respectivement 100 et 40 μm et transférés dans des falcon 50 (Miltenyi Biotec), puis rincés et resuspendus dans du tampon de FACS, tandis que les ganglions ont été filtrés et transférés dans un tube de FACS contenant un tamis cellulaire. La discrimination entre les cellules vivantes et mortes a été réalisée à l'aide du kit *Zombie Aqua™ Fixable Viability* (BioLegend). Le marquage a été réalisé avec les anticorps répertoriés dans le **tableau 5**. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide d'un Symphony A5 (BD) et l'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo (TreeStar).

Single-cell RNA-seq

Des souris *Ubc9^{+/-}* et des souris WT ayant reçu une injection de cellules tumorales B16F10-OVA ont été traitées ou non avec de l'anticorps anti-PD-1 comme précédemment décrit. A jour 20, les tumeurs ont été dissociées avec le traitement Liberase et DNase I décrit dans la section précédente, puis marquées d'abord avec l'anticorps *Zombie Aqua* puis avec CD45.2. Les cellules CD45.2⁺ ont ensuite été isolées sur une Aria (BD) par tri des cellules vivantes et CD45.2⁺. Ces cellules ont été chargées sur un instrument 10x Chromium (10x Genomics) et les bibliothèques ont été préparées en utilisant un kit de réactifs Single Cell 3' (chimie V2) (10x génomique) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les cellules ont été isolées de manière individuelle dans des gouttelettes contenant des billes recouvertes d'amorces uniques et portant des codes-barres 10x, des identifiants moléculaires uniques (UMI) et des séquences poly(dT). De l'ADNc portant les codes-barres a été généré par transcription inverse puis nettoyé en utilisant le kit *DynaBeads MyOne Silane Beads* (ThermoFisher scientifique). L'amplification

de l'ADNc a été réalisée à l'aide du système PCR GeneAmp 9700 with 96-Well Gold Sample Block Module (Applied Biosystems) (98 °C pendant 3 min ; cycle 14x : 98 °C pendant 15 s, 67 °C pendant 20 s et 72 °C pendant 1 min ; maintenu à 4 °C). Une dernière étape de nettoyage de l'ADNs amplifié a été réalisée en utilisant le kit *SPRI select* (Beckman Coulter). Les bibliothèques ont été construites, et la quantification et le contrôle qualité ont été réalisés par dosage fluorométrique Qubit (Invitrogen) à l'aide du kit *dsDNA HS* (High Sensitivity) et du système Bioanalyseur Agilent 2100 à l'aide d'une puce à ADN de haute sensibilité. Les bibliothèques ont été séquencées sur un Illumina HiSeq2500 en utilisant le *paired-end 26x98bp* comme mode de séquençage.

Analyse du single-seq RNA-seq

Le logiciel Cell Ranger *Single Cell Software Suite* a été utilisé pour la génération des tables de comptage. Le package Seurat 4 R2 a été employé pour la normalisation, la réduction de dimension et la formation des groupes (Hao et al., 2021). Brièvement, une stratégie itérative manuelle a été utilisée. En bref, un flux opérationnel standard de Seurat a été appliqué sur l'ensemble des cellules de la matrice de comptage (> 100 UMI) (50 dimensions de PCA ont été utilisées pour la génération du graphique *neighbors* et le calcul UMAP) depuis les données de comptage en passant par le calcul des groupes. Les cellules de mauvaise qualité ont tendance à être composées de bruit de fond et s'agrègent ensemble. Par inspection manuelle, les groupes de cellules à faible UMI (inférieures en moyenne à ~ 1K UMI) ont été supprimés. Ce processus a été répété jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de groupes à faible UMI. Les analyses ont ensuite été regroupées dans un seul objet soumis par la suite à un processus de correction avec *Harmony* (Korsunsky et al., 2019). Le score du cycle cellulaire a été calculé avec la fonction Seurat *CellCyclingScoring* en utilisant la liste de gènes fournie. De même les scores de signature de gènes ont été calculés avec UCell et des listes de signatures de gènes (Andreatta and Carmona, 2021). Afin d'estimer la significativité des proportions des différents types cellulaires entre les conditions, un modèle binomial a été mis en place avec la fonction *glm* dans R. Les moyennes marginales et les *p-values* ont été estimées avec le package *emmeans* (Lenth et al., 2021).

Analyses statistiques

Des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour l'analyse statistique. Toutes les statistiques des analyses ont été réalisées avec le logiciel Prism (Graphpad Software, Inc.). Symboles utilisés : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

SUMOylome

Culture cellulaire

La lignée cellulaire RAW 264.7 a été cultivée à 37°C et 5% de CO₂ dans un milieu de culture complet (*Dulbecco's Modified Eagle's Milieu* (DMEM)) complété avec 10% de FBS + pénicilline et streptomycine. Afin de générer une hypoSUMOylation globale, les cellules ont été traitées avec 2,5 μ M de ML-792 dilué dans du DMSO. Pour les stimulations pathogènes, du LPS a été ajouté à une concentration finale de 10 ng/mL, et du poly(I:C) a été ajouté à une concentration finale de 20 μ g/mL dilué dans du milieu de culture.

SUMOylome

Le protocole employé pour réaliser nos SUMOylomes est celui de *Hendriks et al., 2018*. 250 millions de cellules par réplicat ont été collectées. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à 4°C puis ont été collectées en grattant la plaque. Un lavage supplémentaire a été effectué en falcon 50 par centrifugation puis les cellules ont été lysées dans 10 volumes de tampon de lyse (6 M guanidine, 50 mM TRIS pH 8,5) à température ambiante puis congelées dans de l'azote liquide. La suite du protocole a été réalisée par Ivo Hendriks (Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research) selon la méthode décrite dans l'article *Hendriks et al., 2018*. Brièvement, les peptides SUMO ont subi une première digestion par l'endoprotéase Lys-C (Wako) puis ont été immunoprécipités par l'anticorps anti-SUMO-2/3 (Abcam, ab81371) couplé à des billes « *Protein G Agarose beads* » (Roche). Les échantillons sont ensuite soumis à une deuxième digestion par l'enzyme Asp-N (Roche) afin de réduire la taille du peptide SUMO et permettre son analyse par spectrométrie de masse. Les peptides sont ensuite divisés en six fractions avec des *StageTips* et analysés à l'aide d'un système *EASY-nLC 1200* (Thermo Fisher) couplé à un spectromètre de masse (MS) Q Exactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher) (Rappsilber et al., 2003). Le logiciel MaxQuant a été utilisé afin

de traiter les données obtenues. Les paramètres par défaut ont été employés, mis à part ceux décrits ci-après. Les peptides ont été comparés avec une digestion *in silico* des protéines de la base de données UniProt par Lys-C, Asp-N et Glu-N. Le paramètre « *Label-free quantification* » a été activé et le paramètre « Fast LFQ » désactivé et le *matching* entre les *runs* a été autorisé. La masse maximum des peptides a été fixée à 6 kDa. Une FDR de 1% a été appliquée et les filtres additionnels incluent un score delta minimum de 20 pour les peptides modifiés, et un « *site decoy fraction* » de 2%. Afin de réduire le nombre de faux positifs, des filtres manuels ont été effectués. Tous les peptides requièrent d'avoir une probabilité de localisation supérieure à 80% et un delta score supérieur à 6 ou supérieur à 40 si la modification par SUMO est détectée sur un peptide C-terminal qui ne précède pas un acide aspartique ou un acide glutamique. Tous les peptides modifiés de manière multiple requièrent un delta score supérieur à 40.

Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été purifié par extraction au TRIzol, puis l'ADNc a été généré à partir d'1 µg d'ARN total avec un kit *High-Capacity cDNA ReverseTranscription* (Applied Biosystems). L'ARNm a été évalué par analyse de PCR quantitative en temps réel avec le kit *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) et les amorces listées dans le **tableau 6**. Les résultats ont été normalisés avec le gène de ménage glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Gapdh). La PCR quantitative en temps réel a été réalisée sur une machine *Biorad CFX Connect Real-Time PCR Detection System* (n° 1855201).

Mutagenèse dirigée et clonage

L'ADNc de Maff (Origene, OMu06805D) a été obtenu commercialement, amplifié puis transféré dans un vecteur comprenant un promoteur CMV. La mutagenèse dirigée a été réalisée en utilisant la polymérase Pfu (Aligent, 600252-52) et les amorces décrites dans le **tableau 7**, selon les recommandations du fabricant. L'ADN a été extrait et purifié à l'aide du kit Maxi-prep (Qiagen, n°12162). Les séquences des vecteurs d'expression Maff et ΔMaff ont été vérifiées par séquençage (Eurofins).

Immunoprécipitation SUMO-2/3

Le protocole employé est celui publié par *Barysch et al., 2014*. Après récolte des cellules RAW264.7 et lyse, la quantité de protéines a été quantifiée à l'aide d'une solution de Pierce supplémentée avec du « *Ionic Detergent Compatibility Reagent* » (Thermo Scientific). 1,35 mg d'*Input* a été utilisé pour chaque condition et chaque anticorps (IgG et SUMO-2/3). Le même ratio anticorps/quantité de protéine que le protocole de Barysch et al. a été observé. L'extrait total a d'abord été incubé avec un anticorps monoclonal SUMO-2/3 ou IgG (voir section « Anticorps ») couplés à des billes magnétiques « *Protein G Agarose beads* » (ThermoFisher, 26162). Une étape d'éluion a ensuite été réalisée en ajoutant la séquence peptidique appropriée (IRFRFDGQPI, PM = 1247 Da) afin d'induire une compétition avec les protéines liées à l'anticorps. Enfin, les échantillons ont été précipités à l'aide de TCA 10% puis remis en suspension dans un tampon SDS 2X. Des westerns-blot ont ensuite été réalisés à partir de ces échantillons selon la méthode décrite ci-dessous.

Western-blot

Les cellules RAW 264.7 ont été lavées avec du PBS et récoltées directement dans du tampon Laemmli 1.25X supplémenté avec du 2-mercaptoethanol, puis la concentration des extraits protéiques a été déterminée en utilisant une solution de Pierce supplémentée avec du « *Ionic Detergent Compatibility Reagent* » (Thermo Scientific). Une quantité égale de protéines a été chargée sur des gels à gradient 4-12% (Biorad, n°3450123, n°3450124) ou Trisacétate 3-8% (Biorad, n°3450129). Le contenu du gel a ensuite été transféré sur une membrane de nitrocellulose de 0,2 µm en utilisant le système de transfert turbo Trans-blot (Biorad). Les protéines cibles ont été détectées avec les anticorps appropriés (voir section « anticorps ») grâce au système Odyssey (LiCor).

Test Luciférase

Les vecteurs S-IRE1 et NR1 proviennent de l'étude de Decque et al. et ont été préparés selon la méthode décrite dans l'article *Decque et al., 2016*. Pour les tests rapporteurs, 5×10^5 cellules RAW264.7 ont été mises en culture dans une plaque 24 puits et ont été transfectées pendant 24h avec le réactif *XtremeGENE HP* (Roche), 500 ng de plasmide rapporteur et 100 ng de plasmide TK-Renilla-luciférase (Promega), suivi de 8 h de traitement avec 2,5 µM de ML-792 et 6h de LPS à une concentration de 10 ng/ml de LPS. Le dosage de la Luciférase a été réalisé

avec le système Dual-Glo Luciferase (Promega) selon les recommandations du fabricant. Les résultats des transfections ont été normalisés par rapport aux valeurs de la renilla luciférase.

ChiP-seq

Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde (concentration finale : 1%) neutralisé par la suite à l'aide de glycine (concentration finale : 125 mM). Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS froid puis récoltées et les noyaux ont été isolés à l'aide d'un tampon d'extraction (0,25 M de saccharose, 10 mM de Tris-HCl pH8, 10 mM de MgCl₂, 1% Triton X100, 5 mM 2-mercaptoéthanol, 1X inhibiteur de protéase (Roche cOmplete™ Mini, n° 11836170001)). Les noyaux ont ensuite été lysés en utilisant un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 0,2% SDS, 1X inhibiteur de protéase (Roche cOmplete™, n° 11836170001)). Les échantillons ont ensuite été soniqués (6 cycles de sonication de 30"/30', Bioruptor® Diagenode, n°B01060010). La suite de l'expérience a été réalisée à l'aide du kit *ChIPIT High Sensitivity*® (n°53040) d'Active Motif selon les recommandations du fabricant. Les anticorps utilisés sont décrits dans la section « anticorps ». Brièvement, les échantillons ont été incubés avec les anticorps et le *spike-in* de drosophile pendant une nuit à 4°C, puis ont été incubés avec des billes d'agarose de protéines A/G, et élués. L'ADN a ensuite été purifié sur colonne puis envoyé pour séquençage à l'IGBMC.

Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés : Anti-SUMO2/3 [8A2] monoclonal de souris (abcam, ab-81371), anti-Egr1 monoclonal de lapin (abcam, ab-133695), anti-Maff monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology, sc-166548), anti-Dmap1 polyclonal de lapin (Invitrogen, PA1886), anti-IGG polyclonal de souris (Merck-millipore, 12-371), anti-H2AZ polyclonal de lapin (abcam, ab-4174) et anti-H3.3 monoclonal de lapin (abcam, ab-176840).

Analyses statistiques

Des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour l'analyse statistique. Toutes les statistiques des analyses ont été réalisées avec le logiciel Prism (Graphpad Software, Inc.). Symboles utilisés : *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 ; ****p<0,0001.

Régénération musculaire

Souris

Toutes les procédures de cette étude ont été approuvées par le comité de protection et d'utilisation des animaux de l'Institut Pasteur (2018-0087) et par le ministère de l'Enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation. Sauf indication contraire, des animaux âgés de 6 à 12 semaines ont été utilisés dans cette étude et hébergés sous un cycle lumière / obscurité de 12/12h dans une installation exempte d'agents pathogènes à température et humidité contrôlées. La nourriture et les boissons étaient données à volonté. Les expériences ont été menées sur des souris C57BL/6JRJ (Janvier Labs, France) ou sur des souris génétiquement modifiées croisées avec des souris ayant un fond C57BL/6JRJ. Les *Ubc9^{+/-}*, et les *Tg:Pax7-nGFP* ont été décrites précédemment (Nacerddine et al., 2005; Sambasivan et al., 2009).

Culture Cellulaire

Les cellules satellites ont été cultivées dans 1:1 DMEM:MCDB contenant 20 % de sérum FBS et ITS (1×, *Insulin Transferrin Selenium*; GIBCO). Le milieu avec un filtre de 22 µm. Les cellules ont été étalées sur Matrigel (BD Biosciences ; catalogue #354234) et conservées dans un incubateur (37°C, 6,5% CO₂, 3% O₂).

Blessure musculaire

Afin d'induire une lésion musculaire, les souris ont d'abord été anesthésiées avec de l'isoflurane (2%) puis une injection intramusculaire de 50µl de chlorure de baryum (1,2% dans de l'eau déminéralisée stérile), a été réalisée à l'aide d'une micro-seringue Hamilton de calibre 30 dans le tibia antérieur. Les souris ont été ensuite maintenues à 37°C sur un coussin chauffant jusqu'à leur réveil et surveillées quotidiennement.

Dissection des muscles et isolation des cellules Pax7⁺

Les muscles ont été retirés de l'os dans du DMEM froid, puis hachés finement avec des ciseaux avant d'être digérés avec un mélange de 0,08 % de Collagénase D (Sigma), 0,1 % de Trypsine (ThermoFisher), et 10µg/ml de DNase I (Sigma) dans du DMEM pendant cinq cycles consécutifs d'agitation de 30 min à 37°C à 60 tours/min dans un bain-marie. Après chaque tour, le surnageant a été filtré à travers un tamis cellulaire de 70 µm (Miltenyi) et la collagénase et la trypsine ont été bloquées avec 8% de FBS sur glace. Les surnageants ont été regroupés, filtrés

à travers un tamis cellulaire de 40 µm (Falcon) et centrifugés à 500g pendant 15 min à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans 90% de sérum et 10% de DMSO et congelé à -80°C. Avant isolement par FACS, les échantillons ont été décongelés dans 50 ml de DMEM froid, centrifugés pendant 5 min à 50g à 4 °C, le surnageant a été récupéré, et complété jusqu'à 50 ml avec du DMEM 2% FCS avant d'être centrifugés pendant 15 min à 500g à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans 300 µl de DMEM 2% FCS et 1 µg/mL d'iodure de propidium (Calbiochem, 537060) Les cellules viables ont été isolées en fonction de leur taille, de leur granulosité et du niveau d'expression de la GFP à l'aide d'un FACS Aria III (BD Biosciences), puis reprises dans 250 µl de milieu froid et mises en culture dans des plaques Ibidi 8 puits (Ibidi) auparavant recouvertes de Matrigel (Corning, 354248).

Immunocytochimie et immunohistochimie

Pour l'analyse histopathologique, les muscles du tibia antérieur droit et gauche ont été prélevés et congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Des sections de 7 µm d'épaisseur ont été coupés et colorés à l'hématoxyline-éosine (H&E), au rouge Sirius et à l'Oil Red'O.

Pour l'immunohistochimie, les tissus ont été réhydratés dans du PBS, saturés avec 20% de sérum de chèvre (Sigma Aldrich, MO, USA) et perméabilisés avec 0,5% de Triton X100 (Sigma Aldrich, MO, USA). Les anticorps primaires (listés dans la section « anticorps ») ont été incubés pendant une nuit à 4°C et les anticorps secondaires ont été incubés 1 h à 37°C. Les coupes ont été colorées avec du Hoechst 33342 (Life technologies®, CA, USA) pendant 5 min dans du PBS.

Immunofluorescence

Les cellules en Ibidi ont été fixées dans du PFA à 4% pendant 5 min à température ambiante, lavées deux fois dans du PBS, perméabilisées dans du Triton X-100 à 0,5% pendant 5 min puis bloquées dans du sérum de chèvre à 10% pendant 30 min à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires dans 2% de sérum de chèvre durant la nuit à 4°C, lavées trois fois dans du PBS froid pendant 5 min, et de nouveau incubées avec des anticorps secondaires pendant 45 min à température ambiante. Après un autre lavage au PBS froid, les cellules ont été incubées avec du DAPI dilué dans du PBS (1:10 000 ; D1306 Invitrogen), les cellules ont de nouveau été lavées puis du PBS a été ajouté et les acquisitions microscopiques ont été effectuées. Le marquage EdU a été révélée chimiquement en utilisant le kit Click-iT (C10337, Thermo Fisher).

Analyse et quantification d'images

Les images ont été capturées sur un microscope Nikon Eclipse E800 avec le logiciel Nikon ACT-1 et une caméra DXM1200 à fond clair. Pour l'immunofluorescence, les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope *Zeiss observer2.1 Apotome.2* inversé à l'aide des objectifs 40X et 20X.

Anticorps

Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-F4/80 (Macrophages) de rat (MF48000, Thermo Fisher), anti-CD31 (cellules endothéliales) de rat (550274, BD Pharmingen), anti-Pax7 (cellules satellites) de souris (DSHB), anti-Myogenine (DHSB), anti-Laminine (lame basale) de lapin (L9393, Sigma), Alexa Fluor®488 anti-Souris IgG1(γ 1) de chèvre (115-545-205, Jackson ImmunoResearch Labs), Alexa Fluor® 555 F(ab') anti-lapin IgG de chèvre (A-21430, Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor® 633 anti-souris IgG2b (γ 2b) de chèvre (A-21146, Thermo Fisher Scientific).

Analyses statistiques

Des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour l'analyse statistique. Toutes les statistiques des analyses ont été réalisées avec le logiciel Prism (Graphpad Software, Inc.). Symboles utilisés : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Anticorps	Couleur	Référence
<i>CD19</i>	BUV737	612782 BD
<i>TCR b</i>	BUV395	742485 BD
<i>Ly-6G</i>	BV785	127645 biolegend
<i>CD8a</i>	BV711	100759 biolegend
<i>XCR1</i>	BV650	148220 biolegend
<i>F4/80</i>	BV605	123133 biolegend
<i>Zombie Aqua</i>	BV510	423101 biolegend
<i>CD11b</i>	BV421	562605 BD
<i>CD172a</i>	PerCP 710	46-1721-80 Invitrogen
<i>Ly-6C</i>	FITC	553104 BD
<i>NK1.1</i>	PE/Cy7	25-5941-81 Invitrogen
<i>CD4</i>	PE/Cy5	100513 biolegend
<i>CD11c</i>	PE Tx red	MCD11C17 Invitrogen
<i>CD24</i>	PE	12-0242-81 Invitrogen
<i>CD45.2</i>	APC/Cy7	109823 Biolegend
<i>MHC II</i>	Alexa Fluor 700	56-5321-80 Invitrogen
<i>CD64 (FcyR1)</i>	APC	139305 biolegend

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour le panel de FACS 17-couleurs

Gène	Forward	Reverse
<i>Gapdh</i>	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG
<i>Hprt</i>	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTGTTG	GATTCAACTTGCCTCATCTTAGGC
<i>Ifnb1</i>	TCCAGCTCCAAGAAAGGACG	TTGAAGTCCGCCCTGTAGGT
<i>Ifit2</i>	GCTTTGAGCGCTTTGACACA	GTCGCAGATTGCTCTCCAGT
<i>Irf7</i>	TGCTTTCTAGTGATGCCGGG	GCTCAGGAGCCTGTGGTG
<i>Isg15</i>	GAGCTAGAGCCTGCAGCAAT	TCACGGACACCAGGAAATCG
<i>Usp18</i>	CGGACAGACGTGTTGCCTTA	TCCTCTCTTCTGCACTCCGA
<i>Mx1</i>	GAACGTCAGAAGGAAAGAGCTG	ATCGTCTGGCTCTCCTCAGA
<i>Il6</i>	ATGCTGGTGACAACCACGGCC	AAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTA
<i>RLTR45</i>	ACCTTGACCTTTCTCAATACAT	GACCTCCTCCTAATAACCAAATG
<i>Pax7</i>	GACAAAGGGAACCGTCTGGAT	TGTGAACGTGGTCCGACTG
<i>MyoG</i>	GTGAATGCAACTCCCACAGC	CGCGAGCAAATGATCTCCTG
<i>Ubc9</i>	CTATCCAAGCCAGCCGTAGT	GCCGATCCCCGACATATCA

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR

	Forward	Reverse
Δ <i>MafF</i>	AAAGCCCTGAAGGTCCGGAGGG	GTGTTCTCGCTCAACTCCCTCCGGAC
<i>K14R</i>	AGTTGAGCGAGAACAC	CTTCAGGGCTTT
Δ <i>MafF</i>	CCTGAAGGTCAAGCGAGCTCTGA	CGGCGTGTCTCGCTCAGAGCTCGCT
<i>E16A</i>	GCGAGAACACGCCG	TGACCTTCAGG

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de Maff

Références bibliographiques

- Adamson, A.L., and Kenney, S. (2001). Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* 75, 2388–2399.
- 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 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Degradation and NF- κB Activity. *PLoS One* 7.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786–794.
- Amaria, R.N., Reddy, S.M., Tawbi, H.A., Davies, M.A., Ross, M.I., Glitza, I.C., Cormier, J.N., Lewis, C., Hwu, W.-J., Hanna, E., et al. (2018). Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma. *Nat Med* 24, 1649–1654.
- Anamika, and Spyropoulos, L. (2016). Molecular Basis for Phosphorylation-dependent SUMO Recognition by the DNA Repair Protein RAP80. *J. Biol. Chem.* 291, 4417–4428.
- Andreatta, M., and Carmona, S.J. (2021). UCell: Robust and scalable single-cell gene signature scoring. *Comput Struct Biotechnol J* 19, 3796–3798.
- Andreatta, M., Corria-Osorio, J., Müller, S., Cubas, R., Coukos, G., and Carmona, S.J. (2021). Interpretation of T cell states from single-cell transcriptomics data using reference atlases. *Nat Commun* 12, 2965.
- Andrews, D.M., Sullivan, L.C., Baschuk, N., Chan, C.J., Berry, R., Cotterell, C.L., Lin, J., Halse, H., Watt, S.V., Poursine-Laurent, J., et al. (2012). Recognition of the nonclassical MHC class I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells. *Nat. Immunol.* 13, 1171–1177.
- Aslanukov, A., Bhowmick, R., Guruju, M., Oswald, J., Raz, D., Bush, R.A., Sieving, P.A., Lu, X., Bock, C.B., and Ferreira, P.A. (2006). RanBP2 Modulates Cox11 and Hexokinase I Activities and Haploinsufficiency of RanBP2 Causes Deficits in Glucose Metabolism. *PLoS Genet* 2.
- Assouline, S., Mehta, A., Caimi, P.F., Wang, B., Patel, C., Kim, M.-S., Huszar, D., Berger, A.J., Friedlander, S., Gomez-Pinillos, A., et al. (2019). A Phase 1b/2 Study of TAK-981, a First-in-Class Sumoylation Inhibitor, in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory (r/r) CD20-Positive Non-Hodgkin Lymphoma (NHL). *Blood* 134, 1593–1593.
- Au-Yeung, N., and Horvath, C.M. (2018). Histone H2A.Z Suppression of Interferon-Stimulated Transcription and Antiviral Immunity Is Modulated by GCN5 and BRD2. *IScience* 6, 68–82.
- Ayaydin, F., and Dasso, M. (2004). Distinct In Vivo Dynamics of Vertebrate SUMO Paralogues. *MBoC* 15, 5208–5218.
- Bae, E.-A., Seo, H., Kim, I.-K., Jeon, I., and Kang, C.-Y. (2019). Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. *Arch. Pharm. Res.* 42, 543–548.
- Bahrami, S., and Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in Biological Regulation* 62, 37–49.

- Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., Gaffal, E., Steitz, J., Tolba, R., Kalinke, U., et al. (2014). Immune Cell–Poor Melanomas Benefit from PD-1 Blockade after Targeted Type I IFN Activation. *Cancer Discov* 4, 674–687.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–1211.
- Banerji, R., and Saroj, S.D. (2021). Early growth response 1 (EGR1) activation in initial stages of host–pathogen interactions. *Mol Biol Rep* 48, 2935–2943.
- Barysch, S.V., Dittner, C., Flotho, A., Becker, J., and Melchior, F. (2014). Identification and analysis of endogenous SUMO1 and SUMO2/3 targets in mammalian cells and tissues using monoclonal antibodies. *Nat Protoc* 9, 896–909.
- Bazhin, A.V., von Ahn, K., Fritz, J., Werner, J., and Karakhanova, S. (2018). Interferon- α Up-Regulates the Expression of PD-L1 Molecules on Immune Cells Through STAT3 and p38 Signaling. *Front. Immunol.* 9.
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., and Kirkwood, J.M. (2002). Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, 119–134.
- Benson, D.M., Jr, Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., et al. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti–PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–2294.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Berger, A.J., Friedlander, S., Ghasemi, O., Grossman, S., Koenig, E., Lightcap, E., Milhollen, M., Shah, P., Shapiro, G., Shinde, V., et al. (2019). Abstract 3079: Pharmacodynamic evaluation of the novel SUMOylation inhibitor TAK-981 in a mouse tumor model. *Cancer Res* 79, 3079–3079.
- 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.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Sacconi, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., et al. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107, 2112–2122.
- Blank, C.U., Rozeman, E.A., Fanchi, L.F., Sikorska, K., van de Wiel, B., Kvistborg, P., Krijgsman, O., van den Braber, M., Philips, D., Broeks, A., et al. (2018). Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. *Nat Med* 24, 1655–1661.
- Boddy, M., 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.
- Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H., and Owerbach, D. (2004). A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription

factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* *279*, 27233–27238.

Borcoman, E., Nandikolla, A., Long, G., Goel, S., and Le Tourneau, C. (2018). Patterns of Response and Progression to Immunotherapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 169–178.

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* *373*, 1627–1639.

Borkent, M., Bennett, B.D., Lackford, B., Bar-Nur, O., Brumbaugh, J., Wang, L., Du, Y., Fargo, D.C., Apostolou, E., Cheloufi, S., et al. (2016). A Serial shRNA Screen for Roadblocks to Reprogramming Identifies the Protein Modifier SUMO2. *Stem Cell Reports* *6*, 704–716.

Bossis, G., and Melchior, F. (2006). Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes. *Molecular Cell* *21*, 349–357.

Boudreau, J.E., Stephenson, K.B., Wang, F., Ashkar, A.A., Mossman, K.L., Lenz, L.L., Rosenthal, K.L., Bramson, J.L., Lichty, B.D., and Wan, Y. (2011). IL-15 and type I interferon are required for activation of tumoricidal NK cells by virus-infected dendritic cells. *Cancer Res* *71*, 2497–2506.

Brickner, D.G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P.-C., Widom, J., and Brickner, J.H. (2007). H2A.Z-Mediated Localization of Genes at the Nuclear Periphery Confers Epigenetic Memory of Previous Transcriptional State. *PLoS Biol* *5*, e81.

Brooks, S.A. (2010). Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *1*, 240–252.

Brown, P.W., Hwang, K., Schlegel, P.N., and Morris, P.L. (2008). Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1, SUMO-2/3 and SUMOylation are involved with centromeric heterochromatin of chromosomes 9 and 1 and proteins of the synaptonemal complex during meiosis in men. *Hum Reprod* *23*, 2850–2857.

Brown, S.D., Warren, R.L., Gibb, E.A., Martin, S.D., Spinelli, J.J., Nelson, B.H., and Holt, R.A. (2014). Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival. *Genome Res.* *24*, 743–750.

Bryan, B.A., Walshe, T.E., Mitchell, D.C., Havumaki, J.S., Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. (2008). Coordinated Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Signaling During Skeletal Myogenic Differentiation. *MBoC* *19*, 994–1006.

Burnette, B.C., Liang, H., Lee, Y., Chlewicki, L., Khodarev, N.N., Weichselbaum, R.R., Fu, Y.-X., and Auh, S.L. (2011). The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Res* *71*, 2488–2496.

Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F., and Hay, R.T. (1999). Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* *18*, 3063–3070.

Calmette, A. (1931). Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med* *24*, 1481–1490.

- Chakroun, I., Yang, D., Girgis, J., Gunasekharan, A., Phenix, H., Kærn, M., and Blais, A. (2015). Genome-wide association between Six4, MyoD, and the histone demethylase Utx during myogenesis. *The FASEB Journal* *29*, 4738–4755.
- 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. (2011). Structural and Functional Roles of Daxx SIM Phosphorylation in SUMO Paralog-Selective Binding and Apoptosis Modulation. *Molecular Cell* *42*, 62–74.
- Chang, P.-C., Cheng, C.-Y., Campbell, M., Yang, Y.-C., Hsu, H.-W., Chang, T.-Y., Chu, C.-H., Lee, Y.-W., Hung, C.-L., Lai, S.-M., et al. (2013). The chromatin modification by SUMO-2/3 but not SUMO-1 prevents the epigenetic activation of key immune-related genes during Kaposi's sarcoma associated herpesvirus reactivation. *BMC Genomics* *14*, 824.
- Cheloufi, S., Elling, U., Hopfgartner, B., Jung, Y.L., Murn, J., Ninova, M., Hubmann, M., Badeaux, A.I., Euong Ang, C., Tenen, D., et al. (2015). The histone chaperone CAF-1 safeguards somatic cell identity. *Nature* *528*, 218–224.
- Chen, A.-J., Gao, L., Wang, X.-W., Zhao, X.-F., and Wang, J.-X. (2013). SUMO-Conjugating Enzyme E2 UBC9 Mediates Viral Immediate-Early Protein SUMOylation in Crayfish To Facilitate Reproduction of White Spot Syndrome Virus. *J Virol* *87*, 636–647.
- Chen, H., Tanaka, N., Mitani, Y., Oda, E., Nozawa, H., Chen, J., Yanai, H., Negishi, H., Choi, M.K., Iwasaki, T., et al. (2009). Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Science* *100*, 449–456.
- Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S.B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., et al. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* *20*, 407-414.e4.
- 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.
- Chymkowitch, P., Nguéa P, A., and Enserink, J.M. (2015a). SUMO-regulated transcription: Challenging the dogma. *BioEssays* *37*, 1095–1105.
- Chymkowitch, P., P, A.N., Aanes, H., Koehler, C.J., Thiede, B., Lorenz, S., Meza-Zepeda, L.A., Klungland, A., and Enserink, J.M. (2015b). Sumoylation of Rap1 mediates the recruitment of TFIID to promote transcription of ribosomal protein genes. *Genome Res.* *25*, 897–906.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L., and Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 1365–1368.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* *8*, 265–277.
- Coley, W.B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.* *3–11*.
- Constanzo, J.D., Deng, M., Rindhe, S., Tang, K., Zhang, C., and Scaglioni, P.P. (2016). *Pias1* is essential for erythroid and vascular development in the mouse embryo. *Dev Biol* *415*, 98–110.

- Cossec, J.-C., Theurillat, I., Chica, C., Búa Aguín, S., Gaume, X., Andrieux, A., Iturbide, A., Jouvion, G., Li, H., Bossis, G., et al. (2018). SUMO Safeguards Somatic and Pluripotent Cell Identities by Enforcing Distinct Chromatin States. *Cell Stem Cell* *23*, 742–757.e8.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* *227*, 561–563.
- Crowl, J.T., and Stetson, D.B. (2018). SUMO2 and SUMO3 redundantly prevent a noncanonical type I interferon response. *PNAS* *115*, 6798–6803.
- Cui, Y., Yu, H., Zheng, X., Peng, R., Wang, Q., Zhou, Y., Wang, R., Wang, J., Qu, B., Shen, N., et al. (2017). SENP7 Potentiates cGAS Activation by Relieving SUMO-Mediated Inhibition of Cytosolic DNA Sensing. *PLOS Pathogens* *13*, e1006156.
- Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H., and Allison, J.P. (2010). PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *PNAS* *107*, 4275–4280.
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* *278*, 274–288.
- Darvin, P., Toor, S.M., Sasidharan Nair, V., and Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & Molecular Medicine* *50*, 1–11.
- Dasso, M. (2008). Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div* *3*, 5.
- 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 α . *Cell* *133*, 103–115.
- Decque, A., Joffre, O., Magalhaes, J.G., Cossec, J.-C., Blecher-Gonen, R., Lapaquette, P., Silvin, A., Manel, N., Joubert, P.-E., Seeler, J.-S., et al. (2016). Sumoylation coordinates the repression of inflammatory and anti-viral gene-expression programs during innate sensing. *Nature Immunology* *17*, 140–149.
- Deligne, C., Murdamoothoo, D., Gammage, A.N., Gschwandtner, M., Erne, W., Loustau, T., Marzeda, A.M., Carapito, R., Paul, N., Velazquez-Quesada, I., et al. (2020). Matrix-Targeting Immunotherapy Controls Tumor Growth and Spread by Switching Macrophage Phenotype. *Cancer Immunol Res* *8*, 368–382.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* *31*, 722–733.
- 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 κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* *2*, 233–239.
- Deyrieux, A.F., and Wilson, V.G. (2017). Sumoylation in Development and Differentiation. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, V.G. Wilson, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 197–214.

- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* *1*, 447–456.
- Dohmen, R. (2004). SUMO protein modification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1695*, 113–131.
- Du, J.X., McConnell, B.B., and Yang, V.W. (2010). A Small Ubiquitin-related Modifier-interacting Motif Functions as the Transcriptional Activation Domain of Krüppel-like Factor 4*,. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 28298–28308.
- Dumont, N.A., Wang, Y.X., von Maltzahn, J., Pasut, A., Bentzinger, C.F., Brun, C.E., and Rudnicki, M.A. (2015). Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* *21*, 1455–1463.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* *3*, 991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* *21*, 137–148.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Sheehan, K.C.F., Shankaran, V., Uppaluri, R., Bui, J.D., Diamond, M.S., Koebel, C.M., Arthur, C., White, J.M., et al. (2005). A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nature Immunology* *6*, 722–729.
- Dünnebier, T., Bermejo, J.L., Haas, S., Fischer, H.-P., Pierl, C.B., Justenhoven, C., Brauch, H., Baisch, C., Gilbert, M., Harth, V., et al. (2010). Polymorphisms in the UBC9 and PIAS3 genes of the SUMO-conjugating system and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* *121*, 185–194.
- Egen, J.G., Kuhns, M.S., and Allison, J.P. (2002). CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature Immunology* *3*, 611–618.
- Eichelbaum, K., and Krijgsveld, J. (2014). Rapid Temporal Dynamics of Transcription, Protein Synthesis, and Secretion during Macrophage Activation. *Mol Cell Proteomics* *13*, 792–810.
- Eisenberg-Lerner, A., Ciechanover, A., and Merbl, Y. (2016). Post-translational modification profiling – A novel tool for mapping the protein modification landscape in cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* *241*, 1475–1482.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer* *45*, 228–247.
- Eisenthal, A., Cameron, R.B., and Rosenberg, S.A. (1990). Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vivo by IFN-alpha and its antitumor efficacy against established B16 melanoma liver metastases when combined with specific anti-B16 monoclonal antibody. *J Immunol* *144*, 4463–4471.
- Elder, G.J., Hersey, P., and Branley, P. (1997). Remission of transplanted melanoma--clinical course and tumour cell characterisation. *Clin Transplant* *11*, 565–568.
- Elsässer, S.J., Noh, K.-M., Diaz, N., Allis, C.D., and Banaszynski, L.A. (2015). Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature* *522*, 240–244.

- Evano, B., Khalilian, S., Le Carrou, G., Almouzni, G., and Tajbakhsh, S. (2020). Dynamics of Asymmetric and Symmetric Divisions of Muscle Stem Cells In Vivo and on Artificial Niches. *Cell Reports* *30*, 3195-3206.e7.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., and Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harb Protoc* *2008*, pdb.prot4986.
- Foletta, V.C., Segal, D.H., and Cohen, D.R. (1998). Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1. *Journal of Leukocyte Biology* *63*, 139–152.
- Fraenkel-Conrat, H. (1956). THE ROLE OF THE NUCLEIC ACID IN THE RECONSTITUTION OF ACTIVE TOBACCO MOSAIC VIRUS1. *J. Am. Chem. Soc.* *78*, 882–883.
- Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* *12*, 298–306.
- Fu, J., Xiong, Y., Xu, Y., Cheng, G., and Tang, H. (2011). MDA5 is SUMOylated by PIAS2 β in the upregulation of Type I interferon signaling. *Molecular Immunology* *48*, 415–422.
- Fuertes, M.B., Woo, S.-R., Burnett, B., Fu, Y.-X., and Gajewski, T.F. (2013). Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends in Immunology* *34*, 67–73.
- Fujimura, T., Kambayashi, Y., Ohuchi, K., Muto, Y., and Aiba, S. (2020). Treatment of Advanced Melanoma: Past, Present and Future. *Life (Basel)* *10*.
- 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. *Chemistry & Biology* *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* *62*, 221–224.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* *14*, 1014–1022.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Pedro, J.-M.B.-S., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E.E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., et al. (2014). Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* *5*, 12472–12508.
- 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.
- Garaude, J., Farrás, R., Bossis, G., Charni, S., Piechaczyk, M., Hipskind, R.A., and Villalba, M. (2008). SUMOylation Regulates the Transcriptional Activity of JunB in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* *180*, 5983–5990.
- 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*.
- Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *11*, 861–871.

Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., et al. (2015). Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* *372*, 2018–2028.

Gärtner, A., Wagner, K., Hölper, S., Kunz, K., Rodriguez, M.S., and Müller, S. (2018). Acetylation of SUMO2 at lysine 11 favors the formation of non-canonical SUMO chains. *EMBO Reports* *19*, e46117.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* *436*, 1186–1190.

Gázquez-Gutiérrez, A., Witteveldt, J., Heras, S.R., and Macias, S. (2021). Sensing of transposable elements by the antiviral innate immune system. *RNA* *27*, 735–752.

Gierer, A., and Schramm, G. (1956). Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus. *Nature* *177*, 702–703.

Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* *271*, 501–501.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Current Opinion in Genetics & Development* *15*, 536–541.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pagès, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I., et al. (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res* *21*, 3031–3040.

Gladkova, C., Maslen, S.L., Skehel, J.M., and Komander, D. (2018). Mechanism of parkin activation by PINK1. *Nature* *559*, 410–414.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* *128*, 635–638.

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., Ji, W.-K., Hu, X.-H., Hu, W.-F., Tang, X.-C., Huang, Z.-X., Li, L., Liu, M., Xiang, S.-H., Wu, E., et al. (2014). Sumoylation differentially regulates Sp1 to control cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 5574–5579.

Gonzalez, H., Hagerling, C., and Werb, Z. (2018). Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* *32*, 1267–1284.

Grant, G.A., and Miller, J.F. a. P. (1965). Effect of Neonatal Thymectomy on the Induction of Sarcomata in C 57 BL Mice. *Nature* *205*, 1124–1125.

Grégoire, S., Tremblay, A.M., Xiao, L., Yang, Q., Ma, K., Nie, J., Mao, Z., Wu, Z., Giguère, V., and Yang, X.-J. (2006). Control of MEF2 Transcriptional Activity by Coordinated Phosphorylation and Sumoylation*. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 4423–4433.

- Gresko, E., Ritterhoff, S., Sevilla-Perez, J., Roscic, A., Fröbuis, K., Kotevic, I., Vichalkovski, A., Hess, D., Hemmings, B.A., and Schmitz, M.L. (2009). PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28, 698–708.
- Gresser, I., and Bourali, C. (1969). Exogenous Interferon and Inducers of Interferon in the Treatment of Balb/c Mice inoculated with RC 19 Tumour Cells. *Nature* 223, 844–845.
- Gresser, I., Maury, C., Bandu, M.T., Foiret, D., Trojan, J., and Uriel, J. (1984). Inhibitory effect of mouse interferon on the growth of an embryonal carcinoma in mice. *J Interferon Res* 4, 375–381.
- Griffin, G.K., Wu, J., Iracheta-Vellve, A., Patti, J.C., Hsu, J., Davis, T., Dele-Oni, D., Du, P.P., Halawi, A.G., Ishizuka, J.J., et al. (2021). Epigenetic silencing by SETDB1 suppresses tumour intrinsic immunogenicity. *Nature* 595, 309–314.
- Grifone, R., Demignon, J., Houbron, C., Souil, E., Niro, C., Seller, M.J., Hamard, G., and Maire, P. (2005). Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* 132, 2235–2249.
- Grönholm, J., Vanhatupa, S., Ungureanu, D., Väliäho, J., Laitinen, T., Valjakka, J., and Silvennoinen, O. (2012). Structure-function analysis indicates that sumoylation modulates DNA-binding activity of STAT1. *BMC Biochemistry* 13, 20.
- 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.
- Haanen, J.B.A.G., and Robert, C. (2015). Immune Checkpoint Inhibitors. *Immuno-Oncology* 42, 55–66.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573–3587.e29.
- Hargadon, K.M., Johnson, C.E., and Williams, C.J. (2018). Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology* 62, 29–39.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell* 18, 1–12.
- He, X., Riceberg, J., Soucy, T., Koenig, E., Minissale, J., Gallery, M., Bernard, H., Yang, X., Liao, H., Rabino, C., et al. (2017). Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor. *Nature Chemical Biology* 13, nchembio.2463.
- Helmlinger, D., and Tora, L. (2017). Sharing the SAGA. *Trends in Biochemical Sciences* 42, 850–861.
- Hendriks, I.A., and Vertegaal, A.C.O. (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 581–595.

- Hendriks, I.A., D'Souza, R.C.J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2014). Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature Structural & Molecular Biology* 21, 927–936.
- Hendriks, I.A., Lyon, D., Young, C., Jensen, L.J., Vertegaal, A.C.O., and Nielsen, M.L. (2017). Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 24, 325–336.
- Hendriks, I.A., Lyon, D., Su, D., Skotte, N.H., Daniel, J.A., Jensen, L.J., and Nielsen, M.L. (2018). Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs. *Nature Communications* 9, 1–17.
- 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. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 195–201.
- Hickey, C.M., Wilson, N.R., and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 755–766.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of Serine 303 Is a Prerequisite for the Stress-Inducible SUMO Modification of Heat Shock Factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 2953–2968.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 45–50.
- 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.
- Hoellein, A., Fallahi, M., Schoeffmann, S., Steidle, S., Schaub, F.X., Rudelius, M., Laitinen, I., Nilsson, L., Goga, A., Peschel, C., et al. (2014). Myc-induced SUMOylation is a therapeutic vulnerability for B-cell lymphoma. *Blood* 124, 2081–2090.
- Hopfner, K.-P., and Hornung, V. (2020). Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 501–521.
- Hu, M.-M., Xie, X.-Q., Yang, Q., Liao, C.-Y., Ye, W., Lin, H., and Shu, H.-B. (2015). TRIM38 Negatively Regulates TLR3/4-Mediated Innate Immune and Inflammatory Responses by Two Sequential and Distinct Mechanisms. *The Journal of Immunology* 195, 4415–4425.
- Huang, C., Han, Y., Wang, Y., Sun, X., Yan, S., Yeh, E.T.H., Chen, Y., Cang, H., Li, H., Shi, G., et al. (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J* 28, 2748–2762.
- Huang, C.-J., Wu, D., Khan, F.A., and Huo, L.-J. (2015). DeSUMOylation: An Important Therapeutic Target and Protein Regulatory Event. *DNA and Cell Biology* 34, 652–660.

- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. (1998). The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. *J Exp Med* *188*, 2357–2368.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* *453*, 481–488.
- Hutten, S., Chachami, G., Winter, U., Melchior, F., and Lamond, A.I. (2014). A role for the Cajal-body-associated SUMO isopeptidase USPL1 in snRNA transcription mediated by RNA polymerase II. *J Cell Sci* *127*, 1065–1078.
- Iannello, A., Thompson, T.W., Ardolino, M., Marcus, A., and Raulet, D.H. (2016). Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr Opin Immunol* *38*, 52–58.
- Impens, F., Radoshevich, L., Cossart, P., and Ribet, D. (2014). Mapping of SUMO sites and analysis of SUMOylation changes induced by external stimuli. *PNAS* *111*, 12432–12437.
- Indraccolo, S. (2010). Interferon- α as angiogenesis inhibitor: Learning from tumor models. *Autoimmunity* *43*, 244–247.
- Jacquet, K., Fradet-Turcotte, A., Avvakumov, N., Lambert, J.-P., Roques, C., Pandita, R.K., Paquet, E., Herst, P., Gingras, A.-C., Pandita, T.K., et al. (2016). The TIP60 complex regulates bivalent chromatin recognition by 53BP1 through direct H4K20me binding and H2AK15 acetylation. *Mol Cell* *62*, 409–421.
- Jentsch, S., and Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in Cell Biology* *10*, 335–342.
- Jessen, K.R., Mirsky, R., and Arthur-Farraj, P. (2015). The Role of Cell Plasticity in Tissue Repair: Adaptive Cellular Reprogramming. *Developmental Cell* *34*, 613–620.
- Jia, Y., Claessens, L.A., Vertegaal, A.C.O., and Ovaa, H. (2019). Chemical Tools and Biochemical Assays for SUMO Specific Proteases (SENPs). *ACS Chem. Biol.* *14*, 2389–2395.
- Joe, A.W.B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A., and Rossi, F.M.V. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol* *12*, 153–163.
- Johnson, E.S., and Gupta, A.A. (2001). An E3-like Factor that Promotes SUMO Conjugation to the Yeast Septins. *Cell* *106*, 735–744.
- Jones, D., Crowe, E., Stevens, T.A., and Candido, E.P.M. (2001). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biology* *3*, research0002.1.
- Joung, H., Kwon, S., Kim, K.-H., Lee, Y.-G., Shin, S., Kwon, D.-H., Lee, Y.-U., Kook, T., Choe, N., Kim, J.C., et al. (2018). Sumoylation of histone deacetylase 1 regulates MyoD signaling during myogenesis. *Exp Mol Med* *50*, e427–e427.
- Kamada, R., Yang, W., Zhang, Y., Patel, M.C., Yang, Y., Ouda, R., Dey, A., Wakabayashi, Y., Sakaguchi, K., Fujita, T., et al. (2018). Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory. *PNAS* *115*, E9162–E9171.

- Kang, X., Qi, Y., Zuo, Y., Wang, Q., Zou, Y., Schwartz, R.J., Cheng, J., and Yeh, E.T.H. (2010). SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein-Mediated Gene Silencing during Embryonic Development. *Molecular Cell* *38*, 191–201.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* *441*, 431–436.
- Karyampudi, L., Lamichhane, P., Krempski, J., Kalli, K.R., Behrens, M.D., Vargas, D.M., Hartmann, L.C., Janco, J.M.T., Dong, H., Hedin, K.E., et al. (2016). PD-1 blunts the function of ovarian tumor-infiltrating dendritic cells by inactivating NF- κ B. *Cancer Res* *76*, 239–250.
- Katlinskaya, Y.V., Katlinski, K.V., Yu, Q., Ortiz, A., Beiting, D.P., Brice, A., Davar, D., Sanders, C., Kirkwood, J.M., Rui, H., et al. (2016). Suppression of Type I Interferon Signaling Overcomes Oncogene-Induced Senescence and Mediates Melanoma Development and Progression. *Cell Reports* *15*, 171–180.
- Katlinski, K.V., Gui, J., Katlinskaya, Y.V., Ortiz, A., Chakraborty, R., Bhattacharya, S., Carbone, C.J., Beiting, D.P., Gironde, M.A., Peck, A.R., et al. (2017). Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* *31*, 194–207.
- Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2016). Small Maf proteins (MafF, MafG, MafK): History, structure and function. *Gene* *586*, 197–205.
- Kennedy, L.B., and Salama, A.K.S. (2020). A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *70*, 86–104.
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction—what’s your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* *8*, 550–555.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *22*, 159–180.
- 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.
- Khattar, M., Song, K., Grossman, S., Xega, K., He, X., Idamakanti, N., and Huszar, D. (2019). Abstract 3252: TAK-981: A first in class SUMO inhibitor in Phase 1 trials that promotes dendritic cell activation, antigen-presentation, and T cell priming.
- Kim, J., and Bae, J.-S. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm* *2016*.
- Kim, S., and Paik, W.K. (1965). Studies on the Origin of ϵ -N-Methyl-L-lysine in Protein. *J. Biol. Chem.* *240*, 4629–4634.
- 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.
- Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J.V., van Dijk, W.J., Fish, A., Johnson, E.S., Mann, M., Sixma, T.K., and Pichler, A. (2008). Ubc9 Sumoylation Regulates SUMO Target Discrimination. *Molecular Cell* *31*, 371–382.

- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* *450*, 903–907.
- Koh, J., Kim, S., Kim, M.-Y., Go, H., Jeon, Y.K., and Chung, D.H. (2017). Prognostic implications of intratumoral CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes in pulmonary squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *8*, 13762–13769.
- Kohrt, H.E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., et al. (2014). Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* *123*, 678–686.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* *37*, 937–953.
- Koo, G.C., Hasan, A., and O'Reilly, R.J. (2009). Use of humanized severe combined immunodeficient mice for human vaccine development. *Expert Rev Vaccines* *8*, 113–120.
- Korsunsky, I., Millard, N., Fan, J., Slowikowski, K., Zhang, F., Wei, K., Baglaenko, Y., Brenner, M., Loh, P., and Raychaudhuri, S. (2019). Fast, sensitive, and accurate integration of single cell data with Harmony. *Nat Methods* *16*, 1289–1296.
- Kötter, A., Mootz, H.D., and Heuer, A. (2019). Standard Binding Free Energy of a SIM–SUMO Complex. *J. Chem. Theory Comput.* *15*, 6403–6410.
- 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.
- Kracklauer, M.P., and Schmidt, C. (2003). At the crossroads of SUMO and NF- κ B. *Mol Cancer* *2*, 39.
- Kroonen, J.S., and Vertegaal, A.C.O. (2021). Targeting SUMO Signaling to Wrestle Cancer. *Trends in Cancer* *7*, 496–510.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. *Cell* *129*, 999–1010.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry* *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.
- Kudryashova, E., Kramerova, I., and Spencer, M.J. (2012). Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J Clin Invest* *122*, 1764–1776.
- Kudryavets, Y.I., Bezdenezhnykh, N.O., Lykhova, O.O., Semesiuk, N.I., and Vorontsova, A.L. (2011). The role of interferon as a modifier of epithelial-mesenchymal transition in tumor cells. *Exp Oncol* *33*, 178–181.
- Kuhn, S., Yang, J., and Ronchese, F. (2015). Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8+ T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. *Front Immunol* *6*.

- 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 α through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nature Cell Biology* 10, 547–555.
- Lan, Q., Peyvandi, S., Duffey, N., Huang, Y.-T., Barras, D., Held, W., Richard, F., Delorenzi, M., Sotiriou, C., Desmedt, C., et al. (2019). Type I interferon/IRF7 axis instigates chemotherapy-induced immunological dormancy in breast cancer. *Oncogene* 38, 2814–2829.
- Langston, S.P., Grossman, S., England, D., Afroze, R., Bence, N., Bowman, D., Bump, N., Chau, R., Chuang, B.-C., Claiborne, C., et al. (2021). Discovery of TAK-981, a First-in-Class Inhibitor of SUMO-Activating Enzyme for the Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* 64, 2501–2520.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 11, 750–761.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D’Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461–470.
- Le Grand, F., Grifone, R., Mourikis, P., Houbron, C., Gigaud, C., Pujol, J., Maillet, M., Pagès, G., Rudnicki, M., Tajbakhsh, S., et al. (2012). Six1 regulates stem cell repair potential and self-renewal during skeletal muscle regeneration. *J Cell Biol* 198, 815–832.
- Le Roux, I., Konge, J., Le Cam, L., Flamant, P., and Tajbakhsh, S. (2015). Numb is required to prevent p53-dependent senescence following skeletal muscle injury. *Nat Commun* 6, 8528.
- Lee, J., Ahn, E., Kissick, H.T., and Ahmed, R. (2015). Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway. *For Immunopathol Dis Therap* 6, 7–17.
- Lee, M.H., Mabb, A.M., Gill, G.B., Yeh, E.T.H., and Miyamoto, S. (2011). NF- κ B Induction of the SUMO Protease SENP2: A Negative Feedback Loop to Attenuate Cell Survival Response to Genotoxic Stress. *Molecular Cell* 43, 180–191.
- Lemos, D.R., Babaeijandaghi, F., Low, M., Chang, C.-K., Lee, S.T., Fiore, D., Zhang, R.-H., Natarajan, A., Nedospasov, S.A., and Rossi, F.M.V. (2015). Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 21, 786–794.
- Lenth, R.V., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Riebl, H., and Singmann, H. (2021). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.
- Lepper, C., Partridge, T.A., and Fan, C.-M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138, 3639–3646.
- 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 α to Potentiate Angiogenesis of Hepatocellular Carcinoma by Its SUMO E3 Ligase Activity. *Cancer Cell* 25, 118–131.
- Li, P., Jing, H., Wang, Y., Yuan, L., Xiao, H., and Zheng, Q. (2021). SUMO modification in apoptosis. *J Mol Histol* 52, 1–10.

- Li, T., Santockyte, R., Shen, R.-F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C.H., and Chock, P.B. (2006). Expression of SUMO-2/3 Induced Senescence through p53- and pRB-mediated Pathways*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36221–36227.
- Liang, Y., Tang, H., Guo, J., Qiu, X., Yang, Z., Ren, Z., Sun, Z., Bian, Y., Xu, L., Xu, H., et al. (2018). Targeting IFN α to tumor by anti-PD-L1 creates feedforward antitumor responses to overcome checkpoint blockade resistance. *Nature Communications* 9, 4586.
- 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, J., Blake, S.J., Yong, M.C.R., Harjunpää, H., Ngiow, S.F., Takeda, K., Young, A., O'Donnell, J.S., Allen, S., Smyth, M.J., et al. (2016). Improved Efficacy of Neoadjuvant Compared to Adjuvant Immunotherapy to Eradicate Metastatic Disease. *Cancer Discov* 6, 1382–1399.
- 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 Pathogens* 9, e1003480.
- Liu, X., Heras, G., Lauschke, V.M., Mi, J., Tian, G., and Gastaldello, S. (2020). High glucose-induced oxidative stress accelerates myogenesis by altering SUMO reactions. *Experimental Cell Research* 395, 112234.
- Liu, Y., Bridges, R., Wortham, A., and Kulesz-Martin, M. (2012b). NF- κ B Repression by PIAS3 Mediated RelA SUMOylation. *PLoS One* 7.
- Loeb, K.R., and Haas, A.L. (1994). Conjugates of ubiquitin cross-reactive protein distribute in a cytoskeletal pattern. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8408–8419.
- López, I., Chalatsi, E., Ellenbroek, S.I.J., Andrieux, A., Roux, P.-F., Cerapio, J.P., Jouvion, G., van Rheenen, J., Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2020). An unanticipated tumor-suppressive role of the SUMO pathway in the intestine unveiled by Ubc9 haploinsufficiency. *Oncogene* 39, 6692–6703.
- Lu, C., Klement, J.D., Ibrahim, M.L., Xiao, W., Redd, P.S., Nayak-Kapoor, A., Zhou, G., and Liu, K. (2019). Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7, 157.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Luan, Z., Liu, Y., Stuhlmiller, T.J., Marquez, J., and García-Castro, M.I. (2013). SUMOylation of Pax7 is essential for neural crest and muscle development. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1793–1806.
- Lucarini, V., Buccione, C., Ziccheddu, G., Peschiaroli, F., Sestili, P., Puglisi, R., Mattia, G., Zanetti, C., Parolini, I., Bracci, L., et al. (2017). Combining Type I Interferons and 5-Aza-2'-Deoxycytidine to Improve Anti-Tumor Response against Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 159–169.
- Lumpkin, R.J., Gu, H., Zhu, Y., Leonard, M., Ahmad, A.S., Clauser, K.R., Meyer, J.G., Bennett, E.J., and Komives, E.A. (2017). Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nature Communications* 8, 1–11.

- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J. (2009). Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell* 136, 823–837.
- Lyst, M.J., and Stancheva, I. (2007). A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* 35, 1389–1392.
- Maarifi, G., Maroui, M.A., Dutrieux, J., Dianoux, L., Nisole, S., and Chelbi-Alix, M.K. (2015). Small Ubiquitin-like Modifier Alters IFN Response. *The Journal of Immunology* 195, 2312–2324.
- Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M., and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8, 986–993.
- Mackenzie, S.J., Nicolau, S., Connolly, A.M., and Mendell, J.R. (2021). Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy: Old and New. *Seminars in Pediatric Neurology* 37, 100877.
- 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.
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011). Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *JCO* 29, 1949–1955.
- Majka, S.M., Jackson, K.A., Kienstra, K.A., Majesky, M.W., Goodell, M.A., and Hirschi, K.K. (2003). Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* 111, 71–79.
- Maleckar, J.R., and Sherman, L.A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *The Journal of Immunology* 138, 3873–3876.
- Manente, A.G., Pinton, G., Tavian, D., Lopez-Rodas, G., Brunelli, E., and Moro, L. (2011). Coordinated Sumoylation and Ubiquitination Modulate EGF Induced EGR1 Expression and Stability. *PLOS ONE* 6, e25676.
- Mann, J.E., Smith, J.D., Birkeland, A.C., Bellile, E., Swiecicki, P., Mierzwa, M., Chinn, S.B., Shuman, A.G., Malloy, K.M., Casper, K.A., et al. (2019). Analysis of tumor-infiltrating CD103 resident memory T-cell content in recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 68, 213–220.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23, 549–555.
- Mathé, G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattani, A., Schlumberger, J.R., Hayat, M., and De Vassal, F. (1969). ACTIVE IMMUNOTHERAPY FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKÆMIA. *The Lancet* 293, 697–699.
- 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. *Molecular Cell* 39, 641–652.

- Matsumoto, M., and Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 805–812.
- Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.-S., Shea, L.K., et al. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482, 400–404.
- 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. *Journal of Cell Biology* 135, 1457–1470.
- May, K.F., Jinushi, M., and Dranoff, G. (2013). Chapter 8 - Immunosurveillance: Innate and Adaptive Antitumor Immunity. In *Cancer Immunotherapy (Second Edition)*, G.C. Prendergast, and E.M. Jaffee, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 101–113.
- McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech* 8, 195–213.
- McQuade, J.L., Daniel, C.R., Helmink, B.A., and Wargo, J.A. (2019). Modulating the microbiome to improve therapeutic response in cancer. *The Lancet Oncology* 20, e77–e91.
- 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. *Ann Rev Immunol* 31, 10 1146-020711–074950.
- 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. *Molecular 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.
- Migliazza, A., Lombardi, L., Rocchi, M., Trecca, D., Chang, C., Antonacci, R., Fracchiolla, N., Ciana, P., Maiolo, A., and Neri, A. (1994). Heterogeneous chromosomal aberrations generate 3' truncations of the NFKB2/lyt-10 gene in lymphoid malignancies. *Blood* 84, 3850–3860.
- Mitchison, N.A. (1955). STUDIES ON THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE TO FOREIGN TUMOR TRANSPLANTS IN THE MOUSE. *J Exp Med* 102, 157–177.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27, 16–25.
- Mofarrahi, M., McClung, J.M., Kontos, C.D., Davis, E.C., Tappuni, B., Moroz, N., Pickett, A.E., Huck, L., Harel, S., Danialou, G., et al. (2015). Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308, R576–R589.
- Morales, A., Eiding, D., and Bruce, A.W. (1976). Intracavitary *Bacillus Calmette-Guerin* in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.* 116, 180–183.

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.

Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P.J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 354.

Mosteiro, L., Pantoja, C., Martino, A. de, and Serrano, M. (2018). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16INK4a and IL-6. *Aging Cell* 17, e12711.

Motohashi, H., Katsuoka, F., Miyoshi, C., Uchimura, Y., Saitoh, H., Francastel, C., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2006). MafG Sumoylation Is Required for Active Transcriptional Repression. *Mol Cell Biol* 26, 4652–4663.

Mukhopadhyay, D., and Dasso, M. (2017). The SUMO Pathway in Mitosis. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, V.G. Wilson, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 171–184.

Müller, S., Matunis, M.J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61–70.

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. *Developmental Cell* 9, 769–779.

Nagel, R., Semenova, E.A., and Berns, A. (2016). Drugging the addict: non-oncogene addiction as a target for cancer therapy. *EMBO Rep* 17, 1516–1531.

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.

Nayak, A., and Amrute-Nayak, M. (2020). SUMO system – a key regulator in sarcomere organization. *The FEBS Journal* 287, 2176–2190.

Nayak, A., Lopez-Davila, A.J., Kefalakes, E., Holler, T., Kraft, T., and Amrute-Nayak, M. (2019). Regulation of SETD7 Methyltransferase by SENP3 Is Crucial for Sarcomere Organization and Cachexia. *Cell Reports* 27, 2725-2736.e4.

Neyret-Kahn, H., Benhamed, M., Ye, T., Gras, S.L., 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.

Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2008). Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* 10, 102–109.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immune Receptor. *Immunity* 11, 141–151.

- Novak, M.L., Weinheimer-Haus, E.M., and Koh, T.J. (2014). Macrophage Activation and Skeletal Muscle Healing Following Traumatic Injury. *J Pathol* 232, 344–355.
- 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. *The Journal of Immunology* 157, 4277–4281.
- Old, L.J., Clarke, D.A., and Benacerraf, B. (1959). Effect of Bacillus Calmette-Guérin Infection on Transplanted Tumours in the Mouse. *Nature* 184, 291–292.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A.B., and Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.* 0.
- Orecchioni, S., Reggiani, F., Talarico, G., Mancuso, P., Calleri, A., Gregato, G., Labanca, V., Noonan, D.M., Dallaglio, K., Albin, A., et al. (2015). The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *International Journal of Cancer* 136, E534–E544.
- Parish, C.R. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunology & Cell Biology* 81, 106–113.
- Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R.K., Wollscheid, H.-P., Scheffner, M., Schmidtke, G., and Groettrup, M. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem* 282, 23010–23014.
- Pichavant, C., and Pavlath, G.K. (2014). Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging. *Skelet Muscle* 4, 9.
- Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., and Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation – a mechanistic view. *Biomolecular Concepts* 8, 13–36.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 1958–1966.
- Plaen, E.D., Lurquin, C., Pel, A.V., Mariamé, B., Szikora, J.P., Wölfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum-antigen P91A and identification of the tum- mutation. *PNAS* 85, 2274–2278.
- Pradhan, S.K., Su, T., Yen, L., Jacquet, K., Huang, C., Cote, J., Kurdistani, S.K., and Carey, M.F. (2016). EP400 Deposits H3.3 into Promoters and Enhancers During Gene Activation. *Mol Cell* 61, 27–38.
- Prehn, R.T., and Main, J.M. (1957). Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 769–778.
- Qi, Y., Zuo, Y., Yeh, E.T.H., and Cheng, J. (2014). An Essential Role of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-specific Protease 2 in Myostatin Expression and Myogenesis*. *Journal of Biological Chemistry* 289, 3288–3293.
- Quereux, G., Pandolfino, M.-C., Knol, A.-C., Khammari, A., Volteau, C., Nguyen, J.-M., and Dreno, B. (2007). Tissue prognostic markers for adoptive immunotherapy in melanoma. *European Journal of Dermatology* 17, 295–301.

- Rabellino, A., Andreani, C., and Scaglioni, P.P. (2017). The role of PIAS SUMO E3-ligases in cancer. *Cancer Res* 77, 1542–1547.
- Ran, Y., Liu, T.-T., Zhou, Q., Li, S., Mao, A.-P., Li, Y., Liu, L.-J., Cheng, J.-K., and Shu, H.-B. (2011). SENP2 negatively regulates cellular antiviral response by deSUMOylating IRF3 and conditioning it for ubiquitination and degradation. *Journal of Molecular Cell Biology* 3, 283–292.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75, 663–670.
- Raulet, D.H., and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of NK cell receptors. *Nat Rev Immunol* 9, 568–580.
- Ribet, D., and Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection. *FEBS Letters* 584, 2748–2758.
- Riquelme, C., Barthel, K.K.B., Qin, X.-F., and Liu, X. (2006a). Ubc9 expression is essential for myotube formation in C2C12. *Experimental Cell Research* 312, 2132–2141.
- Riquelme, C., Barthel, K.K.B., and Liu, X. (2006b). SUMO-1 modification of MEF2A regulates its transcriptional activity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10, 132–144.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O’Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma (Massachusetts Medical Society).
- Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocho, E., et al. (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *New England Journal of Medicine* 372, 320–330.
- 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.
- Rogers, R.S., Inselman, A., Handel, M.A., and Matunis, M.J. (2004). SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 113, 233–243.
- Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H., and Wilson, V.G. (2005). A Universal Strategy for Proteomic Studies of SUMO and Other Ubiquitin-like Modifiers*. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 56–72.
- Rosonina, E. (2019). A conserved role for transcription factor sumoylation in binding-site selection. *Curr Genet* 65, 1307–1312.
- 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.
- Saliba, J., Coutaud, B., Solovieva, V., Lu, F., and Blank, V. (2019). Regulation of CXCL1 chemokine and CSF3 cytokine levels in myometrial cells by the MAFF transcription factor. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23, 2517–2525.

- Sambasivan, R., Gayraud-Morel, B., Dumas, G., Cimper, C., Paisant, S., Kelly, R.G., and Tajbakhsh, S. (2009). Distinct Regulatory Cascades Govern Extraocular and Pharyngeal Arch Muscle Progenitor Cell Fates. *Developmental Cell* 16, 810–821.
- Santiago, A., Li, D., Zhao, L.Y., Godsey, A., and Liao, D. (2013). p53 SUMOylation promotes its nuclear export by facilitating its release from the nuclear export receptor CRM1. *Mol. Biol. Cell* 24, 2739–2752.
- Savas, P., Virassamy, B., Ye, C., Salim, A., Mintoff, C.P., Caramia, F., Salgado, R., Byrne, D.J., Teo, Z.L., Dushyanthen, S., et al. (2018). Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nature Medicine* 24, 986–993.
- Saven, A., and Piro, L.D. (1992). Treatment of Hairy Cell Leukemia. *Blood* 79, 1111–1120.
- Schilte, C., Couderc, T., Chretien, F., Sourisseau, M., Gangneux, N., Guivel-Benhassine, F., Kraxner, A., Tschopp, J., Higgs, S., Michault, A., et al. (2010). Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207, 429–442.
- Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2017). SUMO and the robustness of cancer. *Nature Reviews Cancer* 17, 184–197.
- Seidel, J.A., Otsuka, A., and Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol* 8.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity* 19, 59–70.
- Shao, D.-F., Wang, X.-H., Li, Z.-Y., Xing, X.-F., Cheng, X.-J., Guo, T., Du, H., Hu, Y., Dong, B., Ding, N., et al. (2014). High-level SAE2 promotes malignant phenotype and predicts outcome in gastric cancer. *Am J Cancer Res* 5, 140–154.
- Sharma, P., and Allison, J.P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348, 56–61.
- Sharma, P., Yamada, S., Lualdi, M., Dasso, M., and Kuehn, M.R. (2013). Senp1 Is Essential for Desumoylating Sumo1-Modified Proteins but Dispensable for Sumo2 and Sumo3 Deconjugation in the Mouse Embryo. *Cell Reports* 3, 1640–1650.
- Shea, K.L., Xiang, W., LaPorta, V.S., Licht, J.D., Keller, C., Basson, M.A., and Brack, A.S. (2010). Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle Stem Cell Pool during Regeneration. *Cell Stem Cell* 6, 117–129.
- 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.
- Shi, Y., Chen, X., Elsasser, S., Stocks, B.B., Tian, G., Lee, B.-H., Shi, Y., Zhang, N., de Poot, S.A.H., Tuebing, F., et al. (2016). Rpn1 provides adjacent receptor sites for substrate binding and deubiquitination by the proteasome. *Science* 351.
- 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.
- Shin, J.A., Choi, E.S., Kim, H.S., Ho, J.C.Y., Watts, F.Z., Park, S.D., and Jang, Y.K. (2005). SUMO Modification Is Involved in the Maintenance of Heterochromatin Stability in Fission Yeast. *Molecular Cell* *19*, 817–828.
- Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., and Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* *42*, 717–727.
- Sica, A., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Letters* *267*, 204–215.
- Silva-Santos, B., Mensurado, S., and Coffelt, S.B. (2019). $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nature Reviews Cancer* *19*, 392–404.
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D.P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E.E., Remédios, C., et al. (2014). Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature Medicine* *20*, 1301–1309.
- Smet-Nocca, C., Wieruszeski, J.-M., Léger, H., Eilebrecht, S., and Benecke, A. (2011). SUMO-1 regulates the conformational dynamics of Thymine-DNA Glycosylase regulatory domain and competes with its DNA binding activity. *BMC Biochem* *12*, 4.
- Smith, C.W.J., Patton, J.G., and Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative Splicing in the Control of Gene Expression. *Annual Review of Genetics* *23*, 527–577.
- Soffer, R.L. (1973). Post-translational modification of proteins catalyzed by aminoacyl-tRNA-protein transferases. *Mol. Cell. Biochem.* *2*, 3–14.
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* *506*, 316–321.
- Stary, G., Olive, A., Radovic-Moreno, A.F., Gondek, D., Alvarez, D., Basto, P.A., Perro, M., Vrbanac, V.D., Tager, A.M., Shi, J., et al. (2015). A mucosal vaccine against *Chlamydia trachomatis* generates two waves of protective memory T cells. *Science* *348*.
- Staudinger, J.L. (2017). The Molecular Interface Between the SUMO and Ubiquitin Systems. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, V.G. Wilson, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 99–110.
- Stauss, H.J., Van Waes, C., Fink, M.A., Starr, B., and Schreiber, H. (1986). Identification of a unique tumor antigen as rejection antigen by molecular cloning and gene transfer. *Journal of Experimental Medicine* *164*, 1516–1530.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for Covalent Modification of the Nuclear Dot-associated Proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* *139*, 1621–1634.
- 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.

- Stutman, O. (1974). Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science* *183*, 534–536.
- Sugihara, H., Teramoto, N., Nakamura, K., Shiga, T., Shirakawa, T., Matsuo, M., Ogasawara, M., Nishino, I., Matsuwaki, T., Nishihara, M., et al. (2020). Cellular senescence-mediated exacerbation of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* *10*, 16385.
- Sukhatme, V.P. (1990). Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *JASN* *1*, 859–866.
- Sultan, H., Wu, J., Fesenkova, V.I., Fan, A.E., Addis, D., Salazar, A.M., and Celis, E. (2020). Poly-IC enhances the effectiveness of cancer immunotherapy by promoting T cell tumor infiltration. *J Immunother Cancer* *8*.
- Suzawa, M., Miranda, D.A., Ramos, K.A., Ang, K.K.-H., Faivre, E.J., Wilson, C.G., Caboni, L., Arkin, M.R., Kim, Y.-S., Fletterick, R.J., et al. (2015). A gene-expression screen identifies a non-toxic sumoylation inhibitor that mimics SUMO-less human LRH-1 in liver. *ELife* *4*.
- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* *26*, 399–422.
- Synowiec, E., Krupa, R., Morawiec, Z., Wasylecka, M., Dziki, L., Morawiec, J., Blasiak, J., and Wozniak, K. (2010). Efficacy of DNA double-strand breaks repair in breast cancer is decreased in carriers of the variant allele of the UBC9 gene c.73G>A polymorphism. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *694*, 31–38.
- Tagawa, H., Miura, I., Suzuki, R., Suzuki, H., Hosokawa, Y., and Seto, M. (2002). Molecular cytogenetic analysis of the breakpoint region at 6q21–22 in T-cell lymphoma/leukemia cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer* *34*, 175–185.
- Tahk, S., Liu, B., Chernishof, V., Wong, K.A., Wu, H., and Shuai, K. (2007). Control of specificity and magnitude of NF- κ B and STAT1-mediated gene activation through PIASy and PIAS1 cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 11643–11648.
- Tahmasebi, S., Ghorbani, M., Savage, P., Gocevski, G., and Yang, X.-J. (2014). The SUMO Conjugating Enzyme Ubc9 Is Required for Inducing and Maintaining Stem Cell Pluripotency. *STEM CELLS* *32*, 1012–1020.
- Takemoto, M., Kawamura, Y., Hirohama, M., Yamaguchi, Y., Handa, H., Saitoh, H., Nakao, Y., Kawada, M., Khalid, K., Koshino, H., et al. (2014). Inhibition of protein SUMOylation by davidiin, an ellagitannin from *Davidia involucrata*. *J Antibiot* *67*, 335–338.
- Tallman, M.S., and Altman, J.K. (2009). How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* *114*, 5126–5135.
- Tamura, T., Smith, M., Kanno, T., Dasenbrock, H., Nishiyama, A., and Ozato, K. (2009). Inducible Deposition of the Histone Variant H3.3 in Interferon-stimulated Genes. *J Biol Chem* *284*, 12217–12225.
- Tan, B., Shi, X., Zhang, J., Qin, J., Zhang, N., Ren, H., Qian, M., Siwko, S., Carmon, K., Liu, Q., et al. (2018). Inhibition of Rspo-Lgr4 Facilitates Checkpoint Blockade Therapy by Switching Macrophage Polarization. *Cancer Res* *78*, 4929–4942.

Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M.P., 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., 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. *Nature Cell Biology* 10, 538–546.

Tay, R.E., Richardson, E.K., and Toh, H.C. (2021). Revisiting the role of CD4 + T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Therapy* 28, 5–17.

Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature* 226, 1211–1213.

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.

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

Thyrell, L., Erickson, S., Zhivotovsky, B., Pokrovskaja, K., Sangfelt, O., Castro, J., Einhorn, S., and Grandér, D. (2002). Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene* 21, 1251–1262.

Tidball, J.G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology* 17, 165–178.

Tomimaru, Y., Eguchi, H., Nagano, H., Wada, H., Tomokuni, A., Kobayashi, S., Marubashi, S., Takeda, Y., Tanemura, M., Umeshita, K., et al. (2010). MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumour effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 103, 1617–1626.

Truong, K., Lee, T.D., and Chen, Y. (2012). Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of E1 Cys Domain Inhibits E1 Cys Domain Enzymatic Activity. *J. Biol. Chem.* 287, 15154–15163.

Tschurtschenthaler, M., Wang, J., Fricke, C., Fritz, T.M.J., Niederreiter, L., Adolph, T.E., Sarcevic, E., Künzel, S., Offner, F.A., Kalinke, U., et al. (2014). Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut* 63, 1921–1931.

Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., et al. (2006). Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351, 920–926.

Uehara, J., Ohkuri, T., Kosaka, A., Ishibashi, K., Hirata, Y., Ohara, K., Nagato, T., Oikawa, K., Aoki, N., Harabuchi, Y., et al. (2017). Intratumoral injection of IFN- β induces chemokine production in melanoma and augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 mAb. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 490, 521–527.

- Ullmann, R., Chien, C.D., Avantaggiati, M.L., and Muller, S. (2012). An Acetylation Switch Regulates SUMO-Dependent Protein Interaction Networks. *Molecular Cell* 46, 759–770.
- Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomäki, S., Jänne, O.A., Palvimo, J.J., and Silvennoinen, O. (2003). PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102, 3311–3313.
- 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.
- Urban, J.L., Holland, J.M., Kripke, M.L., and Schreiber, H. (1982). Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 156, 1025–1041.
- 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 SENP1 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.
- Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T., and Eberl, M. (2018). $\gamma\delta$ T cell responses: How many ligands will it take till we know? *Seminars in Cell & Developmental Biology* 84, 75–86.
- Virchow, R. (1863). *Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology ...* (J. B. Lippincott).
- Wang, C.-M., Brennan, V.C., Gutierrez, N.M., Wang, X., Wang, L., and Yang, W.-H. (2013a). SUMOylation of ATF3 alters its transcriptional activity on regulation of TP53 gene. *Journal of Cellular Biochemistry* 114, 589–598.
- Wang, L., Wansleeben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W., and Yang, W. (2014). SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep.* 15, 878–885.
- Wang, X., Schoenhals, J.E., Li, A., Valdecanas, D.R., Ye, H., Zang, F., Tang, C., Tang, M., Liu, C.-G., Liu, X., et al. (2017). Suppression of Type I IFN Signaling in Tumors Mediates Resistance to Anti-PD-1 Treatment That Can Be Overcome by Radiotherapy. *Cancer Res* 77, 839–850.
- Wang, Y., Shankar, S.R., Kher, D., Ling, B.M.T., and Taneja, R. (2013b). Sumoylation of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Sharp-1 Regulates Recruitment of the Histone Methyltransferase G9a and Function in Myogenesis*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 17654–17662.
- Watson, J.D. (1965). *Molecular biology of the gene.*
- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell* 29, 653–663.
- Weger, S., Hammer, E., and Heilbronn, R. (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Letters* 579, 5007–5012.
- Wei, F., Schoöler, H.R., and Atchison, M.L. (2007). Sumoylation of Oct4 Enhances Its Stability, DNA Binding, and Transactivation*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 21551–21560.
- Wei, W., Yang, P., Pang, J., Zhang, S., Wang, Y., Wang, M.-H., Dong, Z., She, J.-X., and Wang, C.-Y. (2008). A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 454–459.

- Wertz, K., and Füchtbauer, E.-M. (1998). Dmdmdx- β geo: A new allele for the mouse dystrophin gene. *Developmental Dynamics* 212, 229–241.
- Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 64, 529–564.
- Wilson, V.G. (2017). Introduction to Sumoylation. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, V.G. Wilson, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–12.
- Wolchok, J.D., Kluger, H., Callahan, M.K., Postow, M.A., Rizvi, N.A., Lesokhin, A.M., Segal, N.H., Ariyan, C.E., Gordon, R.-A., Reed, K., et al. (2013). Safety and clinical activity of combined PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab) blockade in advanced melanoma patients. *N Engl J Med* 369, 122–133.
- Wotton, D., Pemberton, L.F., and Merrill-Schools, J. (2017). SUMO and Chromatin Remodeling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 963, 35–50.
- 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.
- Wu, Y., Guo, Z., Wu, H., Wang, X., Yang, L., Shi, X., Du, J., Tang, B., Li, W., Yang, L., et al. (2012). SUMOylation Represses Nanog Expression via Modulating Transcription Factors Oct4 and Sox2. *PLoS One* 7.
- Wu, Z., Huang, R., and Yuan, L. (2019). Crosstalk of intracellular post-translational modifications in cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 676, 108138.
- Yang, S.-H., Jaffray, E., Hay, R.T., and Sharrocks, A.D. (2003). Dynamic Interplay of the SUMO and ERK Pathways in Regulating Elk-1 Transcriptional Activity. *Molecular Cell* 12, 63–74.
- Yang, Y., Xia, Z., Wang, X., Zhao, X., Sheng, Z., Ye, Y., He, G., Zhou, L., Zhu, H., Xu, N., et al. (2018). Small-Molecule Inhibitors Targeting Protein SUMOylation as Novel Anticancer Compounds. *Mol Pharmacol* 94, 885–894.
- Yang, Y., Li, C., Liu, T., Dai, X., and Bazhin, A.V. (2020). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumors: From Mechanisms to Antigen Specificity and Microenvironmental Regulation. *Front. Immunol.* 11.
- Yates, K.E., Korbel, G.A., Shtutman, M., Roninson, I.B., and DiMaio, D. (2008). Repression of the SUMO-specific protease Senp1 induces p53-dependent premature senescence in normal human fibroblasts. *Aging Cell* 7, 609–621.
- Yu, B., Swatkoski, S., Holly, A., Lee, L.C., Giroux, V., Lee, C.-S., Hsu, D., Smith, J.L., Yuen, G., Yue, J., et al. (2015). Oncogenesis driven by the Ras/Raf pathway requires the SUMO E2 ligase Ubc9. *PNAS* 112, E1724–E1733.
- Yukita, A., Hosoya, A., Ito, Y., Katagiri, T., Asashima, M., and Nakamura, H. (2012). Ubc9 negatively regulates BMP-mediated osteoblastic differentiation in cultured cells. *Bone* 50, 1092–1099.
- Yunus, A.A., and Lima, C.D. (2009). Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol. Cell* 35, 669–682.

- Zammit, D.J., Turner, D.L., Klonowski, K.D., Lefrançois, L., and Cauley, L.S. (2006). Residual Antigen Presentation after Influenza Virus Infection Affects CD8 T Cell Activation and Migration. *Immunity* 24, 439–449.
- Zhang, H., and Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J. Cancer* 9, 1773–1781.
- 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, J., Xiao, Z., Qu, C., Cui, W., Wang, X., and Du, J. (2014). CD8 T Cells Are Involved in Skeletal Muscle Regeneration through Facilitating MCP-1 Secretion and Gr1^{high} Macrophage Infiltration. *The Journal of Immunology* 193, 5149–5160.
- Zhao, X. (2018). SUMO-Mediated Regulation of Nuclear Functions and Signaling Processes. *Molecular Cell* 71, 409–418.
- Zhao, Y., Liu, L., and Weng, L. (2021). Comparisons of Underlying Mechanisms, Clinical Efficacy and Safety Between Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 Immunotherapy: The State-of-the-Art Review and Future Perspectives. *Front Pharmacol* 12, 714483.
- Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., and Pandolfi, P.P. (2000). Role of SUMO-1–modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748–2752.
- 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.
- Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* 8, 467–477.

Annexes

Annexe 1 : Ensemble des substrats SUMOylés identifiés par spectrométrie de masse dans les Raw 264.7

ID de la protéine	Nom du gène	Nombre de site SUMO	Ratio (log2) LPS/Contrôle	Ratio (log2) Poly:IC/Contrôle	Intensité absolue-Contrôle (log2)	Intensité absolue-LPS (log2)	Intensité absolue-Poly:IC (log2)
P08046	Egr1	3	5,96	4,13	26,3	31,8	30,2
Q9EST8	Nfkbiz	1	4,39	3,22		27,0	26,3
O54791	Maff	1	1,65	2,14	30,0	31,6	32,2
P09450	Junb	5	1,13	1,54	30,3	31,3	31,9
O70477	Pknx1	1	2,55	2,08	24,7	27,4	27,0
P01101	Fos	2	1,87	1,02	31,1	32,9	32,2
P97471	Smad4	2	0,71	1,69	28,5	29,2	30,4
Q925J9	Med1	1	1,82	1,30	26,2	27,9	27,5
E9PZM7	Scaf11	2	2,24	1,47	23,1	25,4	24,7
Q9R0G7	Zeb2	13	0,65	0,73	34,6	35,3	35,5
Q60665	Skil	2	0,60	2,00	31,0	31,5	33,0
Q8R0F5	Rbmx2	1	1,94	1,93	27,0	28,1	28,1
P47930	Fosl2	2	0,45	0,80	34,6	34,9	35,5
Q5NCY0	Kdm6b	1	0,17	3,00	27,2	27,9	30,2
Q8CD15	Riox2	1	3,26	1,06	23,6	27,1	26,4
Q9DB91	Med29	1	2,16	2,53	23,7	26,1	26,2
P70671	Irf3	1	1,87	1,84	25,5	27,2	27,5
Q8CF60	Zfp263	6	0,79	0,77	34,5	35,3	35,4
Q9D3E6	Stag1	3	1,46	1,43	30,6	31,6	32,0
P23906	Irf2	5	0,52	0,68	34,7	35,1	35,6
Q505F1	Nr2c1	2	0,74	0,83	30,5	31,1	31,5
Q8K2W6	Phf13	2	0,58	0,53	30,3	30,9	31,0
Q00322	Cebpd	1	0,20	1,09	33,1	33,3	34,4
Q9WUK6	Zbtb18	1	1,17	1,67	25,2	26,3	27,6
Q61127	Nab2	2	2,21	2,07	24,6	26,7	26,8
B2RRF6	Znf518a	29	0,42	0,45	32,9	33,2	33,4
Q8CGV9	Tshz3	1	0,99	0,86	25,0	26,1	26,1
Q8BSN5	Phf23	2	0,61	1,15	28,1	28,5	29,3
Q810A1	Znf18	2	0,93	0,65	30,0	30,8	30,8
E9PV66	Myo18b	1	3,68	0,44	23,8	27,6	25,5
Q7TSZ8	Nacc1	2	1,00	1,30	28,3	29,0	30,0
Q61122	Nab1	1	0,75	0,16	29,5	30,3	29,8

Q8C8M1	Sinhcaf	1	0,97	1,51	25,2	25,4	26,2
O88324	Cd83	1	0,45	2,58	22,9	24,2	25,8
Q5DTT3	Tasor2	12	0,65	0,45	30,6	31,2	31,2
Q6NZR2	Msantd2	3	0,42	0,23	30,5	30,9	30,9
Q9CXC9	Etv5	3	0,48	0,82	29,7	30,0	30,6
Q6PAL0	Bend3	3	0,48	0,64	31,1	31,6	31,9
Q91VW9	Zkscan3	3	0,75	0,48	31,9	32,5	32,5
Q99JR8	Smarcd2	3	0,75	0,84	28,0	28,7	28,9
Q8VCD5	Med17	2	1,68	1,50	28,2	29,5	29,4
Q5HZJ0	Drosha	1	1,85	1,80	23,7	26,2	25,6
Q6NV66	Zfp646	12	0,49	0,29	32,2	32,6	32,7
Q62240	Kdm5d	1	0,64	0,69	27,1	27,5	27,8
Q8CBD1	Nrip1	3	1,09	1,04	27,3	28,2	28,5
Q8BIZ6	Snip1	1	0,46	0,30	33,7	34,2	34,2
Q80TY4	St18	9	0,22	0,36	34,9	35,1	35,4
Q8R149	Bud13	2	0,95	0,32	26,4	27,2	26,9
P48972	Mybl2	4	0,25	1,14	28,8	29,0	30,2
P05627	Jun	1				22,7	21,0
Q8CFN5-4	Mef2c	1	3,66	2,78	21,4	26,7	26,1
Q8VI24	Satb2	2	0,73	1,14	31,6	32,2	32,7
Q7TT79	Mcph1	2	0,45	1,69	25,4	25,3	27,0
Q9Z315	Sart1	6	0,60	0,58	35,2	35,8	36,0
P41164	Etv1	2	1,17	1,02	28,0	29,0	29,0
Q3TYA6	Mphosph 8	3	0,65	0,58	29,0	29,5	29,8
Q8VDD9	Phip	11	1,00	0,32	31,6	32,6	32,2
Q921D4	Med6	1	1,78	1,38	27,6	28,5	28,3
F6RGI3	Lcor	5	0,79	0,66	31,9	32,6	32,6
Q61624	Znf148	8	0,47	0,25	34,2	34,6	34,6
Q3UXZ9	Kdm5a	5	0,30	0,39	32,3	32,6	32,9
Q9D968	Hcfc2	8	0,66	0,38	30,6	31,2	31,1
Q99LI5	Znf281	1	0,43	0,33	30,7	31,0	31,1
Q8BHX3	Cdca8	8	0,94	0,03	30,7	31,7	30,9
P39087	Grik2	1	0,97	0,64	28,4	29,0	29,0
Q61136	Prpf4b	1	0,54	0,40	30,2	30,7	30,7
Q571H0	Urb1	2	0,55	0,18	31,0	31,6	31,3
Q9WTJ4	Fiz1	1	0,55	0,72	29,5	30,0	30,3
Q60821	Zbtb17	1	0,88	0,68	26,7	27,2	27,2
Q7TSH3	Znf516	2	0,34	0,58	29,1	29,4	29,7
Q9ESZ8	Gtf2i	5	0,34	0,38	33,6	33,9	34,1
Q80T69	Rsb1	4	0,24	0,70	32,8	33,0	33,7
Q62440	Tle1	1	0,99	2,75	24,1	25,6	27,0
Q61464	Znf638	16	0,31	0,25	31,5	31,8	31,9
Q925H1	Trps1	6	0,13	0,28	30,9	31,0	31,3
Q8BVE8	Nsd2	1	1,50	0,86		25,1	24,5

Q9CW03	Smc3	5	0,45	0,44	30,2	30,6	30,8
Q6PGB6	Naa50	1	0,49	1,22	27,5	28,0	29,0
Q8BN78	Zbtb33	5	0,44	0,36	28,2	28,7	28,7
Q91WV0	Dr1	1	0,56	0,93	26,8	27,2	27,7
Q9JI57	Gtf2ird1	8	0,15	0,43	31,3	31,4	31,8
Q569Z6	Thrap3	15	0,41	0,37	31,0	31,3	31,4
Q3US17	Znf48	2	0,29	0,55	27,2	27,5	27,9
Q8CHY6	Gatad2a	5	0,14	0,34	36,1	36,3	36,6
B1AR17	Chd3	2	0,68	0,94	28,1	29,2	29,1
Q922K7	Nop2	1	1,20	0,56	28,3	29,4	28,8
O70494	Sp3	3	1,01	0,69	30,0	31,3	30,8
A2AUY4	Baz2b	3	0,26	0,55	32,1	32,4	32,8
O08664	Bcl7c	1	0,44	0,77	28,1	28,5	28,9
B1ASA5	Zfp362	2	0,39	0,41	30,3	30,6	30,8
P59997	Kdm2a	1	0,39	0,53	29,5	29,9	30,2
P48377	Rfx1	2	0,23	0,47	29,5	29,7	30,1
Q3U3I9	Znf865	1	2,06	1,56	28,4	29,1	28,7
Q3UH06	Rreb1	11	0,21	0,29	34,7	34,9	35,2
Q9CU62	Smc1a	8	0,62	0,80	29,5	30,2	30,4
Q61164	Ctcf	4	0,44	0,29	35,0	35,3	35,4
E9Q4N7	Arid1b	2	1,59	1,43	23,4	25,6	25,3
Q8R023	Pcgf1	2	0,02	0,12	28,8	28,7	29,0
Q6A068	Cdc5l	3	0,57	0,54	27,1	27,7	27,7
Q03267	Ikzf1	14	0,20	0,05	38,4	38,6	38,7
E9Q6A7	Bptf	15	0,27	0,12	33,8	34,0	34,0
E9PX68	Slc4a1ap	2	0,24	0,14	31,0	31,2	31,2
Q80VM4	Znf579	2	0,72	0,29	27,6	28,3	28,2
Q9JIX0	Eny2	1	0,78	0,32	23,9	24,7	24,5
E9Q7G0	Numa1	4	0,59	0,33	32,0	32,5	32,3
Q61103	Dpf2	3	0,19	0,22	34,2	34,4	34,6
Q9CZJ6	Mis18a	1	2,10	-0,28	27,2	29,0	26,8
A2A791	Zmym4	18	0,17	0,42	34,5	34,6	35,2
Q8R0L9	Tada3	2	1,19	2,16	24,1	25,2	26,6
Q8CH25	Sltm	3	0,70	0,79	29,0	29,7	29,9
Q8CIB9	Esco2	2	0,78	0,53	25,8	26,5	26,3
A2BH40	Arid1a	10	0,48	0,50	29,5	30,1	30,2
Q61550	Rad21	3	0,40	0,30	29,7	30,1	30,1
Q8VCS6	Med9	1	1,55	0,19	25,9	27,2	26,1
Q8R3N6	Thoc1	2	0,26	0,13	32,7	32,8	32,9
Q3V3W4	Zbtb2	2	0,10	0,43	33,9	34,0	34,5
P58269	Dpf3	1	0,16	0,49	28,4	28,6	29,0
Q3TUF7	Yeats2	10	0,04	0,37	34,3	34,3	34,8
Q8VE65	Taf12	1	0,21	0,64	29,9	30,1	30,6
Q80WC3	Tnrc18	2	1,99	1,69	26,0	26,6	27,3
A6H619	Phrf1	2	0,51	0,88	28,4	28,7	29,1

Q505G8	Znf827	6	0,26	0,16	31,6	31,8	31,9
O88379	Baz1a	9	0,07	0,15	35,7	35,8	36,0
P58462	Foxp1	7	0,33	0,30	34,3	34,6	34,8
Q3TIX9	Usp39	2	0,31	0,07	34,6	35,0	34,8
Q6P5G6	Ubxn7	1	0,58	0,85	28,0	28,5	28,9
Q8K015	Cenpo	1	1,81	1,30	24,5	26,0	25,5
Q9DAI4	Zbtb43	5	0,46	0,44	30,3	30,8	30,9
O88665	Brd7	11	0,34	0,24	32,9	33,2	33,2
Q8BZH4	Pogz	12	0,32	0,07	30,5	30,8	30,7
Q66JQ7	Kn11	2	0,07	1,15	25,6	25,5	26,4
Q91VN1	Znf24	2	0,83	1,20	25,7	26,3	26,9
Q8R3B7	Brd8	8	-0,07	0,34	35,5	35,5	36,0
Q9D7W5	Med8	1	1,56	-0,36	24,6	26,3	25,5
Q3TDV8	Zfp444	2	0,57	0,08	31,1	31,5	31,3
Q5SXC4	Vezf1	1	0,19	0,41	29,3	29,4	29,8
P97868	Rbbp6	3	0,47	0,60	27,1	27,5	27,7
Q9WU62	Incenp	3	0,71	0,13	27,8	28,6	28,1
Q9JIZ5	Tfap4	1	2,71	1,34	23,4	26,0	25,0
Q9QX66	Dpf1	2	0,28	0,48	29,4	29,8	30,0
Q6A4J8	Usp7	2	0,62	0,76	28,6	29,0	29,3
Q9DCA5	Brix1	3	0,25	0,17	32,7	33,0	33,1
Q05CL8	Larp7	1	0,38	0,22	29,6	30,3	30,0
Q9CZ92	Cenpp	2	1,33	0,45	25,6	26,8	26,2
Q8BZQ7	Anapc2	1	0,81	0,96	25,2	26,0	26,1
E9Q624	Zfp644	4	0,20	0,42	30,5	30,7	31,0
P97360	Etv6	3	0,20	0,28	32,0	32,2	32,5
O88874	Ccnk	1	1,14	1,03	24,0	24,9	24,8
O08750	Nfil3	9	0,12	0,04	33,8	33,9	34,1
Q3UQU0	Brd9	1	0,31	0,39	27,8	28,1	28,2
G3UVV3	Zfp407	1	0,29	0,44	30,2	30,4	30,7
P59178	L3mbtl2	3	0,17	0,30	32,4	32,6	32,8
Q9Z2E2	Mbd1	10	0,27	0,22	33,3	33,6	33,7
Q3U133	Znf746	1	0,71	0,99	25,4	26,1	26,5
P53564	Cux1	4	0,11	0,60	32,5	32,6	33,2
Q8BHZ4	Znf592	8	0,16	0,37	32,1	32,3	32,6
Q9JHC9	Elf2	1	0,41	0,68	26,2	26,2	26,6
Q61466	Smarcd1	2	1,06	0,54	26,1	26,9	26,4
D3Z0M9	Ddx23	4	0,24	0,14	30,9	31,2	31,2
Q6NZF1	Zc3h11a	7	0,32	0,17	31,8	32,1	32,1
Q9R207	Nbn	3	-0,10	0,37	29,3	28,4	29,1
Q80X82	Sympk	6	0,13	0,19	31,5	31,7	31,8
Q3U1T3	Brms1l	3	0,26	0,00	32,1	32,4	32,3
E9Q784	Zc3h13	6	0,61	-0,03	32,6	33,2	32,9
Q91YU3	Msantd4	1	0,66	0,63	27,5	28,2	28,3
Q8K4J0	Dclre1c	1	0,66	0,46	28,2	28,4	28,4

Q80WQ8	Mis18bp1	16	0,37	-0,10	30,9	31,3	31,0
Q9JJN2	Zfhx4	14	0,04	0,34	31,7	31,7	32,1
Q04692	Smrca1	2	1,67	1,54	27,0	27,6	27,6
A2CG63	Arid4b	4	0,22	0,31	28,6	28,7	29,0
F8VPZ9	Bicra	1	0,27	0,64	25,5	25,8	26,3
Q6P5G3	Mbtd1	3	-0,11	0,47	31,3	31,1	31,8
Q5NCR9	Nsrp1	1	0,18	0,50	32,4	32,5	33,1
Q6P1D7	Slx4	9	0,31	0,11	32,8	33,0	33,0
Q8BG87	Tet3	3	0,17	0,37	28,4	28,5	28,8
Q6P560	Znf182	1	0,72	-0,12	25,1	26,0	25,7
Q8BYH8	Chd9	5	-0,03	0,27	29,7	29,7	30,1
O88907	Pias1	5	0,21	0,19	33,4	33,6	33,8
Q60953	Pml	19	0,08	-0,05	39,1	39,2	39,2
Q9CSN1	Snw1	3	0,53	0,13	29,5	29,9	29,7
E9Q4F7	Ankrd11	1	0,77	0,29	25,5	26,4	26,0
Q80U70	Suz12	6	0,28	0,12	30,5	30,8	30,9
D3Z0K6	Rsb1l	2	-0,19	0,53	30,1	29,9	30,7
O35613	Daxx	4	0,39	-0,11	31,0	31,3	30,9
O35134	Polr1a	2	0,69	0,60	28,3	28,6	28,6
Q8K4Z5	Sf3a1	7	0,30	0,18	30,2	30,5	30,5
Q5M956	Kctd1	3	0,34	0,56	28,1	28,4	28,8
Q9QX47	Son	7	0,18	0,16	30,0	30,2	30,3
Q8BL74	Gtf3c2	1	0,31	0,20	29,1	29,4	29,4
Q8BLM0	Klf8	2	0,03	0,51	27,8	28,0	28,4
Q3V384	Afg1l	1	0,35	0,27	29,1	29,7	29,5
Q6YND2	Znf653	1	0,24	0,17	26,6	26,8	26,9
Q8BUH8	Senp7	2	0,50	-0,16	28,7	29,1	28,6
Q6KAQ7	Zzz3	8	0,16	0,19	33,1	33,3	33,5
Q8JZS6	N4bp2l2	1	0,24	0,36	28,0	27,9	28,2
P41230	Kdm5c	6	0,17	0,29	30,8	31,2	31,3
O88286	Wiz	9	0,05	0,36	33,0	33,0	33,5
Q60974	Ncor1	2	-0,06	0,55	30,1	30,0	30,8
Q52KE7	Ccn1	1	0,23	0,10	25,6	25,9	25,8
Q99PP7	Trim33	6	-0,20	0,24	37,1	36,9	37,5
Q8CHV6	Tada2a	1	0,26	0,33	27,0	27,3	27,5
Q9WV30	Nfat5	3	0,08	0,10	35,0	35,0	35,2
E9Q5F9	Setd2	3	0,27	0,37	27,3	27,4	27,7
Q9CQ82	Itgb3bp	1	0,86	-0,51	29,2	30,0	28,9
Q9CS00	Cactin	1	0,23	0,05	29,9	30,1	30,1
Q60972	Rbbp4	7	0,16	0,12	32,0	32,1	32,2
Q8BZ21	Kat6a	2	0,96	0,69	25,6	27,1	26,5
P15066	Jund	1	0,40	0,50	27,2	27,5	27,7
Q66JV4	Rbm12b2	1	0,37	0,47	25,1	25,4	25,6
P49717	Mcm4	3	0,49	0,45	31,6	32,0	32,3
P55200	Kmt2a	2	0,13	0,19	27,4	27,4	27,6

P97496	Smarcc1	14	0,12	0,25	30,7	30,8	31,0
Q91ZW3	Smarca5	21	0,22	0,14	32,5	32,8	32,8
P0CG49	Ubb	4	0,20	-0,01	33,5	33,7	33,6
Q6P3Y5	Znf280c	15	0,40	-0,10	32,2	32,6	32,3
O35207	Cdk2ap1	1	0,11	0,22	29,4	29,5	29,7
Q3TJB1	Zmym1	3	0,00	0,02	31,3	31,2	31,5
Q9CPY3	Cdca5	1	0,21	0,04	24,9	25,1	25,1
Q8BSQ9	Pbrm1	19	0,11	0,00	37,6	37,7	37,8
Q8VHR5	Gatad2b	7	0,06	0,14	31,7	31,7	31,9
A2AKX3	Setx	2	0,38	0,44	27,2	27,6	27,8
Q8CGF7	Tcerg1	2	0,25	0,77	27,4	27,5	28,3
Q9QZQ8	H2afy	7	0,16	0,03	31,4	31,5	31,6
Q03958	Pfdn6	1	0,10	0,11	27,3	27,4	27,5
Q8BR65	Suds3	2	0,08	0,22	31,8	31,9	32,2
O55201	Supt5h	2	0,74	0,63	27,9	28,9	28,7
Q8VCL4	Zfp451	8	-0,05	0,41	31,7	31,6	32,2
Q04750	Top1	2	0,03	0,22	32,9	33,0	33,3
Q8BTI8	Srrm2	7	0,07	-0,05	33,1	33,2	33,3
O89090	Sp1	1	0,04	0,27	30,5	31,0	31,0
Q9CPR8	Nsmce3	1	0,61	0,36	26,1	26,8	26,8
O88939	Zbtb7a	1	0,18	0,43	25,7	25,9	26,3
E9Q532	Rlf	28	0,07	0,15	35,6	35,7	36,0
Q9CZB6	Med7	1	0,16	0,39	31,8	31,9	32,2
Q5SWW4	Med13	1	0,33	0,18	27,1	27,5	27,4
Q02614	Sap30bp	1			22,0	23,6	22,8
Q6NV83	U2surp	4	0,57	0,68	28,1	28,5	28,7
P28033	Cebp	4	-0,07	0,24	32,1	32,0	32,5
Q91ZU6	Dst	1	0,46	0,50	23,0	23,8	24,4
Q8R2V3	Znf445	2	0,05	0,12	28,7	28,7	28,9
Q80Y19	Arhgap11a	1	0,33	0,50	24,9	24,5	25,2
Q8K088	Zbtb6	1	0,24	0,36	24,8	25,1	25,4
Q9CPY4	Cdk2ap2	2	0,59	0,57	25,2	25,8	26,2
Q922P9	Glyr1	12	-0,06	-0,05	36,1	36,0	36,2
Q14AX6	Cdk12	2	0,45	0,47	26,6	26,5	26,7
P07607	Tyms	1	0,37	0,55	26,1	26,4	26,7
B2RY56	Rbm25	3	0,60	0,53	30,2	30,8	30,9
Q8BX09	Rbbp5	1	-0,05	0,17	29,6	29,5	29,8
O88532	Zfr	2	0,54	0,29	27,7	28,1	28,0
Q68FE8	Znf280d	9	0,20	0,22	30,9	31,1	31,2
Q3TKT4	Smarca4	8	0,15	0,15	29,6	29,8	29,9
Q9CZT4	Polr3e	4	0,04	0,16	32,6	32,6	32,9
Q64092	Tfe3	1	-0,09	0,15	30,2	29,8	30,4
Q9Z2U2	Zfp292	8	-0,09	0,28	31,7	31,7	32,2
Q9Z1D9	Znf394	2	0,19	0,01	28,4	28,6	28,6

Q7TPQ3	Shprh	2	0,24	0,95	26,4	26,7	26,8
B2RX31	Zscan25	1	0,67	-0,21	28,4	28,9	28,0
Q9R210	Tfeb	1	0,81	0,07	29,3	29,9	29,3
P43300	Egr3	1	0,00	2,00			25,6
Q3ULB0	Rbm6	1	0,48	0,60	26,8	27,2	27,4
F7BJB9	Morc3	28	0,03	-0,04	39,1	39,1	39,2
Q5SPL2	Phf12	1	0,16	0,13	30,4	30,5	30,6
O35638	Stag2	2	1,04	0,11	26,9	27,8	27,1
Q8VBU8	Banp	1	0,43	0,60	27,4	27,8	28,2
Q8K2W9	Q8K2W9	3	-0,11	0,26	31,3	31,1	31,9
F6UFZ5	Pcf11	2	-0,28	0,47	30,2	30,1	30,8
Q62280	Ss18	2	0,41	0,66	28,3	28,7	29,0
Q9D824	Fip1l1	3	-0,08	0,17	29,0	28,9	29,3
Q62504	Spen	2	0,21	0,26	29,2	29,4	29,6
Q6ZPK0	Phf21a	2	-0,03	0,23	29,9	29,8	30,2
Q9Z2D6	Mecp2	3	0,14	0,54	29,1	29,3	29,8
Q9ER69	Wtap	1			23,9	22,9	24,0
Q8CCB4	Vps53	1	-0,16	0,64	26,3	26,2	27,1
Q0VEE6	Znf800	5	-0,03	0,06	34,2	34,2	34,4
Q99LQ1	Mbip	7	0,17	-0,04	31,5	31,8	31,8
P70399	Tp53bp1	7	0,27	0,02	29,8	30,0	29,9
Q8C9X6	Epc1	2	-0,02	1,11	25,4	25,0	26,3
Q61026	Ncoa2	1	0,18	0,19	26,5	26,6	26,8
B1AR09	Mllt6	1	0,13	0,23	27,3	27,5	27,6
AOA571B EC4	Lcorl	6	0,27	0,03	29,6	29,9	29,8
Q64523	Hist2h2ac	1			26,6	27,4	25,7
Q9Z1N5	Ddx39b	2	0,40	0,31	30,9	31,3	31,5
Q921F4	Hnrnp1l	1	0,41	0,50	28,9	29,3	29,3
Q6DIC0	Smarca2	1	-0,29	-0,18	25,2	24,9	25,0
Q924W5	Smc6	2	0,35	0,27	27,0	27,2	27,3
Q65Z40	Wapl	2	-0,03	0,53	25,5	25,0	26,0
Q8CGP7	H2ac15	1	-1,09	2,26	25,3	24,8	27,3
A2AAY5	Sh3pxd2b	1	0,02	0,67	25,0	25,3	25,9
Q6GSS7	Hist2h2aa 1;Hist2h2 aa2	3	0,93	1,19	28,9	30,0	30,7
Q8R0K9	E2f4	1	0,35	1,45	23,8	25,1	25,9
Q80Z37	Topors	9	0,06	-0,11	31,4	31,4	31,4
Q9R0I7	Ylpm1	4	-0,03	0,19	30,8	30,7	31,1
Q9D1J3	Sarnp	4	0,19	0,04	31,3	31,4	31,4
Q9CXE2	Bcl7a	4	0,21	-0,05	29,8	30,0	29,8
Q9D2D7	Znf687	15	-0,15	0,38	32,6	32,4	33,2
Q921X6	Polr3f	2	-0,06	0,18	30,5	30,5	30,8
Q08943	Ssrp1	3	0,19	0,50	32,5	32,4	33,0

Q9JIX8	Acin1	5	0,19	0,18	32,0	32,1	32,3
Q9Z1M8	Ik	3	0,31	0,04	27,1	27,4	27,3
E9Q6W4	Znf296	5	-0,39	-0,03	31,2	30,9	31,5
P43277	H1-3	1	0,31	0,25	26,2	26,3	26,4
Q922M5	Cdca7l	3	0,17	-0,18	28,6	28,8	28,6
G3UW50	Zbtb25	1	0,03	-0,01	31,5	31,5	31,6
Q8BW72	Kdm4a	1	0,61	0,13	24,6	25,2	24,8
Q9CT10	Ranbp3	2	0,38	0,24	27,3	27,7	27,7
Q9D7Y9	Slx4ip	1	0,08	0,09	29,0	29,1	29,2
O55128	Sap18	2	0,09	0,10	31,9	32,1	32,1
Q8K3Z9	Pom121	2	0,81	0,22	25,0	25,6	25,4
P62962	Pfn1	3	0,26	0,57	28,0	28,2	28,7
Q9Z103	Adnp	23	0,02	0,06	33,3	33,3	33,5
E9Q5K9	Ythdc1	1	0,12	0,01	26,9	27,0	27,0
O88852	Tspyl1	1	-0,38	0,49	28,4	28,4	28,7
Q8C5N3	Cwc22	1	0,25	0,25	25,5	25,8	25,9
Q922U1	Prpf3	2	0,24	1,92	28,7	28,6	30,1
Q8BLG0	Phf20	1	-0,13	0,62	27,4	27,2	27,9
P55264	Adk	1			21,8	23,9	21,7
Q99NI3	Gtf2ird2	1	0,14	0,28	24,0	24,1	24,4
O54941	Smarce1	9	0,00	0,03	31,6	31,6	31,7
Q64433	Hspe1	1	3,78	1,98		26,7	25,9
Q6PIJ4	Nfrkb	2	-0,22	0,65	28,5	28,3	29,2
P58389	Ptpa	2	0,04	0,81	26,6	26,2	27,0
A2A482	Zmynd8	19	-0,06	-0,21	36,7	36,4	36,6
P26323	Fli1	1	0,01	0,19	30,6	30,6	30,9
Q61827	Mafk	3	0,14	-0,01	28,1	28,3	28,2
Q8K2T8	Paf1	2	-0,17	0,81	26,0	26,0	26,9
Q6PR54	Rif1	12	0,09	0,03	33,9	34,0	34,1
Q91VT1	Nsmce2	3	-0,22	0,79	27,2	27,2	27,9
Q9JIK5	Ddx21	6	0,35	0,15	29,9	30,2	30,1
Q80YR5	Safb2	13	0,12	0,10	36,3	36,4	36,6
Q05BH3	Dhx16	1	1,10	0,44	25,6	26,9	26,1
P15314	Irf1	1	0,80	-0,34	23,7	24,3	23,2
O08810	Eftud2	4	0,26	0,09	31,2	31,5	31,5
A2A7B5	Prdm2	6	0,08	0,14	29,6	29,5	29,8
Q91XP5	Gira3	1	0,32	0,07	27,3	27,6	27,8
Q922V4	Plrg1	1	0,66	0,75	26,4	27,1	27,3
Q3U319	Rnf40	1	0,32	0,29	28,5	28,7	28,8
Q8BJA3	Hmbox1	2	0,08	-0,04	31,7	31,8	31,8
Q8C879	Zfp202	2	0,49	0,39	26,1	26,6	26,7
Q8VCG9	Rfxap	1	0,29	0,33	26,5	26,8	26,9
Q91YE5	Baz2a	2	0,31	0,15	27,5	27,8	27,8
P30415	Nktr	2	0,19	0,10	29,7	29,9	30,0
A2AGH6	Med12	1	0,12	0,50	24,4	24,3	24,8

Q8R4U0	Stab2	1	0,00	0,35	27,8	27,8	28,3
P08042	Zfp1	2	0,06	0,03	30,2	30,2	30,4
Q8C092	Taf5	2	-0,19	0,78	25,9	25,5	26,7
O35691	Pnn	8	0,16	0,09	29,1	29,1	29,4
Q8C827	Zfp62	1	0,02	-0,02	32,9	33,0	33,1
Q8BGS3	Zkscan1	1	0,23	-0,02	28,8	29,1	28,9
A2AJT4	Pnir	1	0,13	0,68	24,6	24,7	25,4
Q9DAT2	Mrgbp	1	-0,26	0,64	26,7	26,5	27,4
P45481	Crebbp	1	0,17	0,21	24,9	25,0	25,2
Q80TG1	Kansl1	2	-0,15	0,26	28,1	27,9	28,5
Q60862	Orc2	3	0,11	-0,15	29,4	29,5	29,4
Q91Z49	Fyttd1	1	1,54	-1,08	25,8	27,4	24,0
Q9EQM6	Dgcr8	3	0,39	-1,54	29,3	29,7	28,3
E9Q7E2	Arid2	11	0,09	-0,04	31,7	31,8	31,8
Q8BIH0	Sap130	3	0,01	-0,08	32,4	32,3	32,5
E9Q5G3	Kif23	1	-0,15	0,90	24,8	24,6	25,4
O09106	Hdac1	4	-0,08	-0,13	32,7	32,6	32,8
Q920S3	Gatad1	1	-0,18	0,51	27,4	27,1	27,9
Q6P5D8	Smchd1	14	-0,03	-0,26	35,4	35,4	35,3
P26369	U2af2	1	0,79	1,06	26,8	27,7	27,8
Q8K019	Bclaf1	12	-0,13	-0,22	34,1	34,0	34,1
Q02395	Mtf2	1	-0,52	-0,90	28,9	28,6	28,2
Q07231	Zscan21	3	0,08	-0,10	30,7	30,8	30,8
P63166	Sumo1	3	0,40	-0,31	31,5	31,9	31,7
Q3UTQ7	Prdm10	1	0,14	0,34	26,1	26,0	26,6
Q80U49	Cep170b	1	-0,39	1,05	25,9	25,9	26,3
Q8C5D8	Pias2	4	0,01	0,12	30,8	30,8	31,0
P84089	Erh	1	0,09	-0,04	29,6	29,7	29,8
Q810V0	Mphosph 10	4	-0,05	0,51	28,7	28,6	29,2
P63280	Ube2i	6	-0,02	-0,07	35,7	35,6	35,8
Q6A026	Pds5a	3	0,34	0,21	27,3	27,6	27,6
Q3UFB2	Znhit6	10	0,00	-0,02	31,2	31,2	31,3
P43276	H1-5	3	0,03	-0,07	26,8	26,8	26,8
E9PZ11	Zfp651	1	0,19	0,09	28,5	28,7	28,8
P16045	Lgals1	1	0,43	0,61	25,1	25,2	25,6
Q91WT8	Rbm47	1			26,2	25,4	25,1
Q99NB9	Sf3b1	9	0,02	-0,15	35,8	35,8	35,8
Q6IFZ6	Krt77	2	0,29	0,21	26,6	27,0	27,4
Q60749	Khdrbs1	2	0,03	0,09	32,6	32,7	32,8
Q8R3P9	Slf1	3	0,13	-0,09	28,7	28,7	28,7
Q9R002	Ifi202	1			23,4	22,8	23,5
E9Q6J5	Bod1l	1	-0,09	0,48	25,6	25,5	26,1
O54988	Slk	1	0,08	0,25	25,2	25,1	25,3
P28704	Rxb	1	0,14	-1,10	28,8	28,8	28,6

Q9QZH3	Ppie	1	0,07	0,12	25,4	25,5	25,7
E9PZ26	Brd1	3	0,01	0,08	27,2	27,2	27,4
Q9R1C7	Prpf40a	3	0,42	0,01	29,6	30,0	29,9
Q62511	Zfp91	1	-0,02	0,06	27,1	27,0	27,3
Q80YR6	Rbbp8	2	-0,21	-0,24	26,3	26,3	26,6
P62751	Rpl23a	2	0,12	-0,72	29,3	29,2	28,8
P49117	Nr2c2	1	0,38	0,20	25,5	25,7	25,7
Q8CDD9	Lrif1	6	0,17	-0,28	34,2	34,4	34,1
Q4VA53	Pds5b	7	-0,09	0,27	30,4	30,3	30,8
Q99LH1	Gnl2	1	0,13	-0,19	23,5	24,5	24,4
Q09XV5	Chd8	1	-0,18	0,62	27,6	27,4	28,2
P97785	Gfra1	1	-0,20	0,68	24,8	25,5	25,6
P62806	H4c1;H4c11;H4c12;H4c14;H4c2;H4c3;H4c4;H4c6;H4c8;H4c9;H4f16;Hist1h4m	3	0,27	0,32	31,0	31,3	31,5
Q640M1	Utp14a	2	0,13	-0,03	28,1	28,2	28,2
Q91WD1	Polr3d	10	-0,28	0,03	34,9	34,6	35,1
P62270	Rps18	2	0,18	-0,03	28,1	28,3	28,2
Q3UEB3	Puf60	2	0,11	0,13	31,4	31,5	31,7
Q9Z0H3	Smarca1	3	-0,01	0,18	28,2	28,2	28,5
P09405	Ncl	12	0,00	0,08	30,9	30,9	31,1
P23198	Cbx3	4	-0,14	-0,62	32,4	32,3	32,0
Q9DBF7	Cwc25	1	0,09	-0,06	31,4	31,5	31,5
Q9D0M2	Cdca7	2	0,32	-0,31	30,6	30,9	30,4
P62317	Snrpd2	4	0,12	-0,07	32,3	32,3	32,3
Q8R3C6	Rbm19	1	0,29	-0,06	27,5	27,9	27,6
Q8VDM6	Hnrnpul1	5	0,08	-0,03	32,7	32,7	32,8
Q9D4H9	Phf14	1	0,63	1,21	26,6	26,8	27,5
B1AZI6	Thoc2	3	0,56	0,64	25,2	25,8	26,1
Q80XN4	Zfp871	3	0,04	0,01	33,8	33,8	34,0
Q8R081	Hnrnp1	7	-0,02	-0,52	34,9	34,7	34,4
P20065	Tmsb4x	1	0,01	0,18	26,8	26,7	27,0
Q61768	Kif5b	1	0,13	0,17	26,6	26,6	26,8
Q9WU00	Nrf1	1	0,08	0,15	27,3	27,4	27,5
P27790	Cenpb	1	1,54	-0,93	26,1	27,2	25,5
P04184	Tk1	1	0,05	0,27	25,8	25,4	25,7
Q924A0	Tcf7l2	1	0,48	-0,19	25,7	26,1	25,9
G3X8R5	Qrich1	1	-0,04	0,86	28,2	28,0	29,1
Q3TKY6	Cwc27	2	0,41	0,01	29,0	29,5	29,2
Q8K0L9	Zbtb20	1	-0,61	0,35	34,7	34,2	35,2
A2AWL7	Mga	14	-0,19	0,02	33,2	33,0	33,4

Q6PDG5	Smarcc2	13	-0,12	-0,17	33,7	33,6	33,7
Q91VN6	Ddx41	1	0,46	1,18	25,4	26,1	26,2
Q6P1E1	Zmiz1	1	-0,49	1,21	22,9	23,1	25,1
Q3UWM4	Kdm7a	1	-0,17	0,84	23,3	23,5	24,7
Q60793	Klf4	1			23,8	24,5	
Q9QYB1	Clic4	1	0,03	0,20	24,4	24,4	24,7
Q8R0C0	Polr3gl	1	0,08	0,18	23,4	22,6	24,0
Q9DBE9	Ftsj3	5	0,24	0,23	29,2	29,4	29,5
P62843	Rps15	3	0,48	0,23	29,2	29,7	29,6
Q9Z2N8	Actl6a	2	0,14	0,39	28,3	28,4	28,8
Q9WUV0	Orc5	1	0,02	0,11	27,0	26,9	27,2
Q9R190	Mta2	8	-0,09	0,08	29,6	29,5	29,8
Q9Z150	Zbtb12	1	-0,18	-0,06	27,2	27,0	27,3
Q8CH18	Ccar1	2	-0,10	-0,07	35,5	35,3	35,6
Q8CHW1	Thap1	1				24,3	
Q922S8	Kif2c	1	0,40	-0,73	24,5	25,2	23,7
Q8BMQ2	Gtf3c4	1	0,12	0,03	27,1	27,3	27,3
O35368	Ifi203	8	-0,03	-0,25	36,4	36,7	36,7
P35980	Rpl18	2	-0,45	0,50	26,0	25,5	26,2
Q8BVY0	Rsl1d1	6	0,07	0,00	30,8	30,8	30,9
Q56A10	Znf608	1	-0,14	0,36	26,1	26,0	26,6
P70388	Rad50	1			22,8	22,8	23,7
Q5SU73	Coil	2	0,30	0,09	25,7	26,0	25,8
P03966	Mycn	1	0,25	0,92	25,2	25,1	25,7
Q6ZWR6	Syne1	1	-0,08	0,47	27,3	27,1	27,8
P56581	Tdg	2	-0,25	0,03	34,3	34,0	34,5
P61965	Wdr5	3	-0,20	-0,04	32,4	32,2	32,5
O88466	Znf106	8	-0,30	-0,14	34,6	34,3	34,6
A0A087W NL7	Srcap	2	-0,20	0,01	27,5	27,2	27,6
Q9CR57	Rpl14	2	0,20	0,02	26,1	26,2	26,1
Q08874	Mitf	4	0,07	0,05	31,5	31,2	31,5
Q8BGA5	Krr1	2	-0,17	0,09	27,3	27,1	27,6
Q9D7Z3	Nol7	1	0,83	0,47	23,9	25,0	24,7
Q8CGC6	Rbm28	1	0,33	0,34	25,4	25,8	25,9
Q9JIC3	Dclre1a	4	-0,36	-0,67	28,8	28,0	27,9
B1AXP6	Tomm5	1	-0,21	0,41	28,0	27,7	28,4
Q8K327	Champ1	1	-0,53	-0,17	26,6	26,1	26,4
Q61818	Rai1	6	-0,44	-0,35	31,3	30,9	31,0
Q9D2L9	Fam111a	4	-0,13	-0,02	31,1	30,9	31,1
Q9JK30	Orc3	2	0,25	-0,03	27,0	27,2	27,1
Q8BKP2	Zfp189	2	-0,17	0,44	28,0	27,8	28,6
P42225	Stat1	2	0,42	0,36	27,1	27,5	27,5
P62754	Rps6	2	-0,12	0,65	24,6	24,4	25,2
Q6PDQ2	Chd4	24	-0,16	-0,07	35,3	35,2	35,4

Q69ZK6	Jmjd1c	2	-0,30	0,16	28,6	28,4	28,9
P33215	Nedda1	1	-0,18	-0,04	25,2	24,9	25,2
P48754	Brca1	3	-0,47	-0,03	27,9	27,4	27,9
A2AJ71	Fubp3	1	-0,30	0,11	27,9	27,4	27,9
Q8CGZ0	Cherp	2	0,15	0,15	26,9	27,0	27,2
Q5F293	Zbtb4	1	-0,01	-1,01	29,6	29,5	28,9
P10854	H2bc14	1	0,17	-0,32	26,4	26,4	26,2
Q8VBW5	Bbx	3	-0,55	0,13	26,7	26,3	27,0
Q8R5C8	Zmynd11	1			22,8	25,0	22,6
P53566	Cebpa	3	-0,04	-0,17	35,0	34,9	35,0
Q9EPU4	Cpsf1	3	0,15	0,00	27,1	27,2	27,2
Q8BM75	Arid5b	1	0,05	0,31	26,3	26,6	26,8
Q8CG46	Smc5	4	-0,15	-0,26	29,1	29,0	29,0
Q8CDM1	Atad2	13	0,16	-0,53	30,6	30,7	30,2
Q62318	Trim28	14	-0,02	-0,25	36,5	36,5	36,5
Q9D6J3	Yju2	1	0,23	-0,14	26,0	26,2	26,0
Q8CDC7	Zbtb9	4	-0,02	0,07	33,4	33,5	33,7
Q3U8K7	Kmt5b	1	-0,09	0,10	30,1	30,0	30,3
P48193	Epb41	1	-0,19	-0,82	27,7	27,3	27,0
O09053	Wrn	7	-0,25	0,12	33,5	33,2	33,7
P49710	Hcls1	1			24,6	22,7	23,7
P97875	Jdp2	2	-0,46	0,07	32,1	31,5	32,2
Q8VE37	Rcc1	1	-0,02	-0,04	26,9	26,9	27,0
Q5UAK0	Mier1	1	0,14	-0,32	25,1	25,2	25,0
E9Q2S7	Zfp266	1	0,06	0,04	26,8	26,8	26,9
Q99LI7	Cstf3	1	-0,02	-0,04	27,4	27,4	27,5
P97825	Jpt1	1	0,06	0,27	24,7	24,7	25,0
E9PWW9	Rsf1	33	0,02	-0,10	37,3	37,3	37,4
P47963	Rpl13	4	-0,08	-0,14	30,0	30,0	30,1
Q9CY66	Gar1	1	-0,41	0,03	25,5	25,0	25,8
Q8CGN4	Bcor	2	-1,24	-0,35	26,9	26,0	26,7
Q52KG4	Zbtb45	1	-0,49	0,08	28,7	28,4	29,1
P53026	Rpl10a	2	-0,11	-0,08	30,1	30,0	30,2
Q8CHC8	Adnp2	7	-0,30	-0,17	31,1	30,8	31,1
Q8BPZ8	Abraxas1	1	-0,14	-0,11	25,1	25,0	25,1
Q61139	Pcsk7	1	-0,24	0,10	26,1	25,9	26,3
Q9EQI8	Mrpl46	2	0,33	-0,05	26,1	26,7	26,0
P46471	Psmc2	2	0,37	0,32	27,6	27,8	27,9
Q76KJ5	Cd3eap	1			25,2	25,3	24,8
Q06507	Atf4	1	-0,36	0,72	26,0	25,7	26,4
Q3LR78	Zbtb38	11	-0,10	-0,12	30,2	30,2	30,3
Q8BI73	Znf775	1	0,00	-0,15	26,6	26,6	26,6
Q61188	Ezh2	3	-0,18	0,02	27,9	27,7	28,0
Q61687	Atrx	45	0,21	-0,21	35,5	35,7	35,4
O88974	Setdb1	4	-0,03	-0,31	29,3	29,4	29,1

Q61990	Pcbp2	2	-0,22	-0,52	27,3	27,0	26,7
Q64511	Top2b	35	0,02	-0,03	37,6	37,7	37,8
Q9Z2U0	Psma7	1	0,42	0,35	25,7	26,0	26,0
P54987	Acod1	1					23,0
Q9D8M7	Phf10	6	-0,06	-0,13	28,9	28,8	28,9
Q8K224	Nat10	2	0,68	0,37	27,4	27,7	27,5
Q9WTI7	Myo1c	1	0,15	0,26	24,9	25,1	25,3
Q9Z1X4	Ilf3	2	-0,10	0,09	28,3	28,2	28,5
Q8CIG3	Kdm1b	1	0,41	-0,33	27,7	28,1	27,4
O08788	Dctn1	2			24,9	24,5	25,6
P27661	H2afx	4	-0,01	-0,20	32,2	32,2	32,2
P28352	Apex1	1	-0,73	0,23	26,3	26,0	26,9
Q8VIG1	Rest	2	-0,02	-0,12	25,1	25,2	25,0
P83917	Cbx1	6	-0,06	-0,32	30,7	30,7	30,6
Q9CYH6	Rrs1	2	0,27	-0,01	28,3	28,8	28,4
Q80TC5	Pogk	1	-0,53	0,25	25,4	24,3	25,3
Q91W96	Anapc4	3	-0,30	-0,13	34,0	33,8	34,0
Q60996	Ppp2r5c	1	0,31	-0,06	24,2	24,5	24,3
Q8BJ05	Zc3h14	5	-0,16	-0,66	29,6	29,5	29,3
P62827	Ran	3	-0,18	-0,17	29,1	28,9	29,1
O70551	Srpk1	1	-0,29	-0,23	26,6	26,4	26,7
Q3TEA8	Hp1bp3	2	-0,04	0,03	27,0	27,0	27,1
Q9DBY0	Foxp4	5	-0,49	0,07	29,3	28,9	29,6
Q99NB8	Ubqln4	1	0,54	0,29	25,0	25,5	25,3
Q8R0A2	Zbtb44	2	-0,06	-0,43	30,2	30,1	29,9
Q60520	Sin3a	5	-0,62	0,16	30,1	29,4	30,3
Q9JLM4	Zmym3	5	-0,08	-0,22	32,3	32,3	32,3
P70297	Stam	1	-0,24	0,00	27,4	27,1	27,4
Q3U9G9	Lbr	1	0,64	-0,27	23,8	24,9	23,5
Q00PI9	Hnrnpul2	1	0,06	-0,11	29,0	29,0	29,0
Q9EPQ8	Tcf20	10	-0,20	-0,02	34,3	34,1	34,5
Q80W88	Homez	3	-0,08	-0,23	33,4	33,3	33,3
P60762	Morf4l1	1	-0,31	0,64	24,0	23,6	24,2
P97305	Nfatc3	1	-1,49	1,56	26,7	25,5	27,7
Q80X32	Q80X32	3	0,15	-0,35	32,4	32,6	32,2
P63168	Dynll1	1	0,00	-0,14	25,6	25,5	25,5
P33174	Kif4	1			23,8	23,1	23,1
Q9WVJ2	Psm13	1	0,08	0,23	26,0	26,1	26,4
Q05AH6	Spindoc	1	-0,39	-0,16	29,3	28,9	29,3
Q5DW34	Ehmt1	7	-0,39	-0,01	29,0	28,6	29,1
B2RQG2	Phf3	4	-0,80	0,35	30,4	29,6	30,8
Q8CCE9	E4f1	2	-0,02	-0,27	24,8	24,8	24,7
Q52KI8	Srrm1	1	0,19	-0,34	29,0	29,1	29,0
Q91ZX6	Senp2	1	0,13	0,10	25,9	26,4	26,3
Q6ZQK0	Ncapd3	1			26,1	24,7	25,8

A2AQH4	Bcor1	2	0,03	-0,62	29,0	27,9	27,5
Q61881	Mcm7	1	0,23	0,40	26,7	26,9	27,3
P61027	Rab10	1			27,2	27,0	26,9
P51912	Slc1a5	1	-0,21	0,34	29,8	29,6	30,5
Q8BK64	Ahsa1	1	0,12	0,10	26,6	26,7	26,9
Q6ZPV2	Ino80	2	-0,68	-0,26	25,9	25,2	25,9
Q9D654	Zfp84	2	-0,37	0,18	26,3	26,0	26,8
Q8BJW7	Eme1	1	-0,10	0,15	28,8	29,0	29,3
Q99PV0	Prpf8	6	-0,80	0,78	31,1	30,2	31,7
Q9Z172	Sumo3	4	0,08	0,05	33,3	33,5	33,6
Q497V5	Srbd1	1					23,1
F8VPQ2	Arid4a	9	-0,27	-0,25	30,8	30,4	30,7
Q8BRH4	Kmt2c	1			21,9	24,3	
Q8K1K4	Cenpi	2	0,19	-0,46	28,6	28,8	28,2
Q62383	Supt6h	1			21,9		21,7
E9Q166	Atad2b	3	0,39	-0,31	26,1	26,5	25,8
Q3TN34	Micall2	1	0,50	-0,57	25,9	26,2	25,8
Q69Z61	Pwwp2a	3	-0,04	-0,35	30,2	30,3	29,9
Q80WE4	Kif20b	5	-0,30	0,08	28,9	28,7	29,1
P18760	Cfl1	2	-0,30	0,26	24,1	23,9	24,8
Q80Y44	Ddx10	2	-0,15	-0,38	27,6	27,5	27,5
O88569	Hnrnpa2b 1	1			24,5		22,7
Q99NG0	Rad54l2	1	-0,26	-0,10	25,2	24,9	25,1
Q8CFE3	Rcor1	4	-0,18	0,03	29,5	29,2	29,7
Q80W31	Znf569	1					25,1
Q8BND4	Ints6l	6	-0,07	0,11	31,2	31,2	31,4
Q3UJB0	Sf3b2	3	0,04	-0,18	30,3	30,4	30,2
Q91VL9	Zbtb1	2	-0,21	-0,03	33,1	33,0	33,2
Q99ME9	Gtpbp4	1	-0,05	0,02	23,2	22,6	23,1
Q61029	Tmpo	3	-0,10	-0,09	28,2	28,0	28,2
Q7TPD0	Ints3	3	-0,47	0,24	32,3	31,7	32,8
Q8QZV7	IntS13	2	-0,16	-0,11	26,7	26,6	26,8
O88508	Dnmt3a	3	-0,12	-0,04	28,6	28,6	28,7
O35218	Cpsf2	1	0,09	0,12	23,8	24,0	24,1
O70546	Kdm6a	2	-0,62	-0,06	28,6	28,1	28,7
P29452	Casp1	1	-0,37	-0,01	28,2	28,0	28,2
Q5PSV9	Mdc1	6	-0,26	0,13	36,1	35,9	36,4
Q9JF3	Riox1	1	0,10	-0,03	25,5	25,5	25,5
Q8VEK6	Ing3	2	-0,54	0,42	30,3	29,8	30,8
Q2VPQ9	Meaf6	1	-0,24	0,30	27,9	27,6	28,3
Q8BP18	Zfp101	1	0,09	-0,08	25,4	25,4	25,4
DOQMC3	Mndal	10	0,04	0,17	37,3	37,4	37,7
Q99K48	Nono	2	-0,08	-0,02	25,6	25,5	25,6
P68033	Actc1	1	-0,24	-0,04	29,6	29,4	29,7

A2A6A1	Gpatch8	1	-0,18	-0,05	27,4	27,3	27,5
O54790	Mafg	2	-0,21	-0,11	35,3	35,1	35,4
E9PVX6	Mki67	54	-0,01	-0,22	35,8	35,8	35,7
P63323	Rps12	1	0,07	-0,01	23,4	24,0	24,1
Q8CID0	Kat14	1	-0,22	-0,23	29,0	28,8	28,9
Q8K2Q9	Shtn1	2	0,12	-0,15	28,6	28,7	28,6
Q60765	Atf3	2	0,64	-0,92	26,5	26,9	25,3
O88685	Psmc3	2	0,11	-0,92	25,6	25,7	24,9
P26039	Tln1	2	-0,19	0,42	25,7	25,4	25,9
Q80TP3	Ubr5	1	0,06	-0,04	25,9	26,0	26,0
E9PYH6	Setd1a	1	-0,06	0,06	26,7	26,6	26,7
P35550	Fbl	1				21,8	
P14733	Lmnb1	2	0,29	-0,14	25,3	25,5	25,2
Q91YQ5	Rpn1	1	-0,13	0,37	24,8	24,4	24,9
P97311	Mcm6	2	-0,10	0,24	27,3	27,4	27,7
P17742	Ppia	3	-0,03	0,57	27,3	26,8	27,6
P62192	Psmc1	1			22,6	23,4	23,6
Q9Z1Q9	Vars	1					
P35979	Rpl12	1	-0,40	0,69	25,3	25,5	25,7
Q91VC3	Eif4a3	1			25,8	25,7	25,1
Q61753	Phgdh	1			24,3	25,0	24,7
P19253	Rpl13a	1	-0,16	-0,05	23,5	23,3	23,5
P07091	S100a4	1	-0,23	0,01	28,2	28,0	28,4
Q69ZQ2	Isy1	1	-0,09	0,06	24,9	24,5	25,1
Q8VEK3	Hnrnpu	3	0,00	-0,01	25,4	25,5	25,6
E9Q555	Rnf213	2	0,05	-0,13	25,9	25,6	26,0
Q0VBD2	Mcm10	2	-0,06	0,05	29,8	29,7	29,9
Q9WU42	Ncor2	1					
P58252	Eef2	4	-0,23	0,25	27,5	27,2	27,8
P00920	Ca2	1	0,24	-0,24	23,3	22,8	23,2
Q9DAR7	Dcps	1	0,03	-0,05	25,7	25,7	25,8
Q99KP6	Prpf19	1	-0,57	0,36	25,0	24,4	25,4
Q9CXH7	Sgo1	3	0,06	-0,22	26,6	26,7	26,5
Q3UIX4	Srsf11	1	-0,06	-0,07	26,6	26,5	26,5
Q8BTQ0	PcgF3	1	-0,16	0,13	26,4	26,2	26,6
Q99NH0	Ankrd17	1			24,9	25,3	24,8
Q61081	Cdc37	1			25,8	26,1	26,1
Q6P4S8	Ints1	1			23,2	22,5	25,0
Q9D0I9	Rars	1			22,3	21,1	23,8
O35344	Kpna3	1	-0,30	0,36	24,6	24,3	25,6
Q99MU3	Adar	2	-0,25	-0,09	28,3	28,1	28,3
P47955	Rplp1	1			24,2	22,3	24,5
P61222	Abce1	1	0,10	0,11	30,1	30,2	30,4
Q923A2	Spdl1	1	-0,15	0,05	25,9	25,6	25,8
Q61656	Ddx5	1	-0,16	-0,30	25,2	25,1	25,0

Q8BJW5	Nol11	2	0,27	0,03	28,1	28,3	28,1
O09130	Nfatc2ip	1	-0,81	0,08	24,0	23,4	24,2
Q9JJA4	Wdr12	1	0,25	0,08	26,6	26,8	26,8
Q9WVL2	Stat2	1	-0,52	0,40	24,3	23,8	24,8
Q6NZL1	Dhx37	1					
P49718	Mcm5	1			25,3	25,4	25,6
P11499	Hsp90ab1	3	0,43	0,29	27,0	27,4	27,4
Q8VIJ6	Sfpq	1	0,15	0,11	28,5	28,7	28,8
A0A0G2JGH0	Fxr1	1					24,5
Q5SSI6	Utp18	1			25,4	23,3	
Q91VE6	Nifk	2	0,63	0,11	24,5	25,1	24,9
P35700	Prdx1	3	-0,10	0,13	27,3	27,2	27,6
Q60848	Hells	1	0,52	-0,16	26,5	27,1	26,6
Q921N6	Ddx27	1			23,3		
Q9QXZ0	Macf1	1	-0,16	0,08	27,1	26,8	27,2
Q69ZX6	Morc2a	1	-0,14	0,09	28,9	28,8	29,1
P14869	Rplp0	1	0,05	-0,05	28,6	28,6	28,7
P17225	Ptbp1	1	0,13	-0,15	26,6	26,7	26,5
Q61937	Npm1	5	0,24	-0,13	29,9	30,0	29,8
P43247	Msh2	1			24,0	21,2	22,8
P97310	Mcm2	1	0,31	-0,15	29,7	30,0	29,7
Q9Z2X1	Hnrnpf	1	-0,09	-0,04	28,5	28,4	28,6
P70121	Zhx1	4	-0,28	-0,01	28,9	28,6	29,0
P83870	Phf5a	1	-0,09	0,03	24,8	24,6	24,9
P38532	Hsf1	1	-0,72	0,14	27,3	26,6	27,5
Q8K284	Gtf3c1	2	0,44	-0,65	26,3	26,8	26,7
Q921F2	Tardbp	1	0,03	-0,08	25,0	25,1	25,1
Q8C9B9	Dido1	1	-0,02	0,31	26,0	26,2	26,4
Q7TT18	Atf7ip	1	-0,18	-0,02	24,1	24,0	23,5
P24452	Capg	1	-1,11	-0,11	28,3	28,1	28,3
P80317	Cct6a	1			23,0		22,6
Q8BJ71	Nup93	1	0,08	-0,02	26,6	26,7	26,8
P60335	Pcbp1	2	-0,24	-0,12	27,4	27,2	27,3
O35841	Api5	1	-0,06	0,12	25,6	25,5	25,7
Q8BML9	Qars	1	0,43	0,59	25,1	25,5	25,8
P51881	Slc25a5	1	0,06	-0,62	24,4	24,4	24,6
P62918	Rpl8	1	-0,52	-0,14	25,8	25,2	25,7
Q61686	Cbx5	4	-0,04	-0,12	29,1	29,1	29,1
P62702	Rps4x	1	-0,18	-0,46	25,6	25,3	25,2
P62315	Snrpd1	1	0,14	0,10	25,1	25,4	25,5
O70305	Atxn2	1	-0,22	-0,21	27,8	27,5	27,7
Q9D8E6	Rpl4	4	-0,23	-0,20	31,9	31,6	31,7
P80315	Cct4	1			23,8	23,0	22,4
Q64525	Hist2h2bb	2	-0,04	-0,21	29,8	29,8	29,8

P62281	Rps11	1	-0,49	-1,14	24,6	23,8	24,1
Q921E2	Rab31	1					24,1
P14148	Rpl7	1			23,2	24,6	23,8
Q8CIE6	Copa	1	0,13	0,81	25,2	25,1	25,8
Q64127	Trim24	10	-0,15	-0,01	36,2	36,1	36,4
Q8BGS0	Mak16	1	-1,23	0,50	26,0	25,0	26,2
P05064	Aldoa	6	-0,13	-0,11	28,2	28,1	28,2
Q9D8N0	Eef1g	1	-0,10	0,08	28,9	28,8	29,1
P10126	Eef1a1	8	-0,29	-0,02	29,6	29,3	29,8
Q7TPV4	Mybbp1a	3	-0,24	-0,07	27,9	27,6	27,9
Q8BTM8	Flna	1	0,27	-0,33	31,8	32,1	31,8
Q922D8	Mthfd1	1			24,5	24,3	24,6
Q9WTN3	Sreb1	2	-0,06	-0,46	25,5	25,6	25,3
P63158	Hmg1b1	1			23,8	24,2	23,4
P70372	Elavl1	1	0,26	-0,77	25,6	26,0	25,6
Q9EQ61	Pes1	1	-0,01	-0,17	32,1	32,1	32,0
Q8CDG3	Vcpip1	2	-0,20	-0,11	28,2	27,9	28,1
P99024	Tubb5	4	-0,34	0,17	27,6	27,3	27,9
A2AIV2	Virma	1	0,04	-0,02	28,0	28,1	28,2
P61290	Psme3	1	-0,14	-0,22	23,7	23,5	23,6
P51859	Hdgf	1	-0,01	0,01	29,2	29,1	29,3
O35892	Sp100	1	-1,05	0,10	26,3	25,7	26,1
A0A0R4J1 C4	Zswim9	1	-0,01	-0,12	27,3	27,3	27,3
Q9CQI7	Snrpb2	1	-0,07	-0,24	25,7	25,7	25,6
Q60780	Gas7	1	0,33	0,09	27,3	27,6	27,5
Q6NVF9	Cpsf6	1	0,05	-0,31	24,4	24,4	23,8
P63017	Hspa8	7	-0,35	0,34	28,2	27,8	28,6
P53568	Cebpg	1	-0,02	-0,05	25,9	26,0	26,0
Q9Z1F9	Uba2	12	-0,05	-0,34	35,4	35,4	35,2
Q01853	Vcp	1	-0,15	0,07	24,7	24,5	24,9
Q8K0H5	Taf10	1	-0,29	-0,08	23,9	21,2	24,0
P79457	Uty	1	-0,47	-0,05	27,0	26,5	27,1
Q9CYR6	Pgm3	1			23,8	24,4	
Q7TPL6	Zfp748	2	-0,36	0,09	27,3	26,9	27,5
P08775	Polr2a	4	-0,20	0,14	27,9	27,6	28,1
E9Q462	Zfp758	1	-0,34	-0,40	23,3	22,6	23,1
G3XA30	Nsmce4a	1	0,58	-0,30	25,5	25,9	25,4
Q8R1M0	Hmces	1	0,42	0,28	26,2	26,3	26,2
P27546	Map4	1	-0,30	0,00	25,0	24,7	25,0
P25206	Mcm3	4	-0,02	-0,27	30,4	30,4	30,3
E9Q6A2	Serpine3	1	-0,01	-0,58	30,4	30,5	30,6
Q07113	Igf2r	1	-0,60	0,36	28,4	27,9	28,9
Q9D7S7	Rpl2211	1			24,8	24,3	23,0
O70126	Aurkb	2			23,0	25,0	25,7

Q3UKJ7	Smu1	1	-0,79	-0,93	24,5	23,8	24,0
Q05BA5	Ncoa3	1	-0,21	-0,12	23,8	24,0	24,3
Q8C854	Myef2	1	-0,15	0,15	28,8	28,7	29,1
Q80XJ2	Rnf168	1	-0,24	-0,12	25,8	25,4	25,6
Q9DBY8	Nvl	2	-0,48	0,22	26,2	25,7	26,5
Q6P4T2	Snrnp200	4	0,29	0,55	29,5	29,8	30,2
P49312	Hnrnpa1	4	-0,64	0,43	29,1	28,5	29,7
P57080	Usp25	2	-0,72	-0,24	25,1	24,5	25,0
Q8BU00	Ikzf5	1	0,01	-0,70	27,5	27,6	27,5
Q9DBJ1	Pgam1	2	-0,70	-0,08	24,9	24,2	24,9
Q9ESU6	Brd4	3	-0,37	0,07	32,6	32,2	32,8
O88543	Cops3	1	0,32	0,87	27,5	27,6	28,4
Q8R323	Rfc3	2	-0,16	-0,12	28,6	28,4	28,6
P08249	Mdh2	1			22,7	22,7	23,0
Q99PL5	Rrbp1	4	-0,21	-0,12	30,8	30,7	30,8
Q61301	Ctnna2	1	0,42	-0,63	23,7	24,4	23,3
P62889	Rpl30	2	0,80	1,31	24,0	23,7	25,0
Q9QXK2	Rad18	5	-0,31	-0,19	29,1	28,7	29,0
Q8K1R7	Nek9	1			24,8	24,3	24,3
P09103	P4hb	1	-0,71	-0,10	23,9	22,2	24,3
O70133	Dhx9	4	-0,09	-0,21	30,6	30,5	30,5
O70230	Znf143	1	0,07	-0,75	27,3	27,4	27,0
Q80YR7	Clspn	1	-0,15	0,39	23,8	22,8	24,2
Q9JL35	Hmgn5	2	-0,15	-0,32	29,7	29,5	29,5
Q3UHX0	Nol8	3	0,05	-0,51	27,8	27,9	27,4
Q99JX1	Taf11	1	-0,70	-0,28	25,2	23,9	25,0
Q569Z5	Ddx46	1	-0,17	-0,06	28,1	27,9	28,2
Q8BG05	Hnrnpa3	1	-0,36	-0,07	29,0	28,6	29,0
Q3U1J4	Ddb1	1	0,15	0,63	28,4	28,6	29,4
D6RE33	Edc4	1	-0,38	-0,43	25,8	25,3	25,5
Q6DID3	Scaf8	1	-0,01	-0,35	24,8	24,7	24,6
Q501J6	Ddx17	1			25,1	25,4	23,9
P70288	Hdac2	2	-0,16	-0,18	30,4	30,2	30,4
Q80WJ7	Mtdh	1			22,8	24,3	23,6
Q78IK4	Apool	1	-0,59	0,31	26,4	25,5	26,6
Q8JZX4	Rbm17	1	0,01	-1,20	24,8	24,7	24,1
P62082	Rps7	1	-0,76	-0,51	25,0	23,8	24,6
P61089	Ube2n	1	-0,51	-0,14	23,5	22,8	23,4
Q9ESX5	Dkc1	4	-0,09	-0,28	31,9	31,8	31,8
Q8K310	Matr3	5	0,09	-0,12	30,6	31,2	30,6
Q6PDM1	Msl1	3	0,39	-0,73	30,2	30,5	29,8
Q61233	Lcp1	4	-0,50	-0,03	28,1	27,7	28,2
Q9Z1Q5	Clic1	1	-0,16	-0,01	27,0	26,7	27,0
Q8VDD8	Washc1	1	-0,33	-0,09	25,9	25,4	25,8
Q60973	Rbbp7	4	-0,23	-0,40	30,0	29,7	29,8

A2BE96	Pkn3	1	-0,06	-0,19	26,9	26,7	26,7
Q61792	Lasp1	1	0,00	-0,84	24,4	24,4	23,7
Q9R155	Slc26a4	1	-0,39	0,11	29,7	29,2	29,6
P62852	Rps25	1	-0,05	-0,15	24,6	24,5	24,6
Q9EQU5	Set	1	-1,44	-0,40	24,8	23,3	24,3
A2ANY6	Mdn1	1	-0,11	0,03	29,5	29,3	29,7
P27773	Pdia3	1	-0,26	-0,39	25,5	25,2	25,2
Q3U821	Wdr75	5	0,40	-0,61	29,0	29,2	28,4
Q8BX70	Vps13c	2	0,28	-1,20	28,0	28,0	26,8
P17751	Tpi1	1	0,07	-0,81	25,9	25,8	25,6
P34884	Mif	2	-0,48	-0,31	26,7	26,3	26,7
Q9CU65	Zmym2	15	-0,21	-0,18	32,1	31,9	32,1
Q6KCD5	Nipbl	2	-0,32	-0,25	28,3	28,0	28,2
Q9Z0P5	Twf2	1	-0,37	-1,21	24,6	24,0	24,5
Q9JHU9	lsyna1	1			25,8	24,2	23,5
P06745	Gpi	1	-0,27	-0,12	25,4	25,2	25,4
P84228	Hist1h3b; Hist1h3c; Hist1h3d; Hist1h3e; Hist1h3f; Hist2h3b; Hist2h3c1 ;Hist2h3c 2	2	-0,58	-0,30	29,2	28,9	29,0
P58501	Paxbp1	1	-0,17	-0,19	28,6	28,4	28,6
P48678	Lmna	3	0,07	-0,36	28,2	28,2	28,0
P62242	Rps8	3	-0,12	-0,38	27,2	27,1	27,0
Q6Z WV3	Rpl10	1			24,0	24,7	24,8
Q8VI84	Noc3l	1	-0,07	-0,15	27,5	27,4	27,5
Q9QYB5	Add3	1	-0,32	-0,22	27,0	26,6	26,8
P10404	P10404	1	-0,45	-0,59	24,4	23,4	24,1
Q3TXT3	Inip	1	-0,28	-0,52	25,9	25,8	25,7
Q8R317	Ubqln1	2	-0,32	-0,30	28,8	28,5	28,6
P54822	Adsl	1	-0,91	-0,18	26,3	25,4	26,0
Q9Z1N2	Orc1	1	1,07	2,10	24,6	26,5	27,1
Q9CZV5	Supt7l	2	-0,62	-0,08	34,4	33,7	34,4
Q9DC33	Hmg20a	1	-2,01	-1,05	27,0	25,6	26,7
O08580	Esrra	4	-0,33	-0,39	32,3	32,0	32,1
Q9QYI3	Dnajc7	1			24,3	24,3	
P06800	Ptprc	1	-1,07	0,09	27,1	26,7	27,3
P09411	Pgk1	6	-0,28	-0,34	28,1	27,8	27,9
P40124	Cap1	1	-0,75	-0,41	25,2	24,4	24,6
F6ZEW4	Cse1l	1				28,0	27,6
P17182	Eno1	13	-0,27	-0,13	29,8	29,6	29,9
O35685	Nudc	1	-0,83	-0,25	25,9	25,2	25,6

D3Z0X4	Zfp617	1	-0,06	-0,19	25,3	25,3	25,3
Q9QZ67	Ppm1d	1	0,04	-0,33	27,1	27,1	26,9
P23116	Eif3a	1	-0,37	-2,00	27,3	27,0	26,3
P63242	Eif5a	1	-0,99	-0,01	26,2	25,0	26,2
Q62203	Sf3a2	2	-0,27	-0,10	26,3	26,0	26,3
Q9CZ96	Zcrb1	1	-0,15	-0,31	24,7	24,9	24,5
Q9JHI7	Exosc9	1	-0,07	-0,54	30,5	30,3	30,1
Q3TLH4	Prrc2c	4	-0,65	-0,50	28,3	27,8	28,2
O35375-5	Nrp2	1	-0,60	0,02	24,9	24,0	25,3
Q9QZD4	Erc4	2	-0,19	-0,21	29,5	29,3	29,4
P80318	Cct3	1	0,29	-2,67	26,1	26,4	24,1
O08784	Tcof1	13	0,42	-0,24	34,5	35,2	34,4
Q6ZPI0	Jade1	2	-0,58	-0,15	25,9	25,4	25,9
Q6ZQ88	Kdm1a	1	-2,43	0,12	27,8	26,8	28,1
A2APB8	Tpx2	2	-1,81	-2,19	28,2	25,1	24,7
Q920B9	Supt16h	6	-0,94	-0,11	30,9	30,1	31,0
O88942	Nfatc1	5	-0,89	0,37	35,5	34,7	36,0
Q8CG47	Smc4	3	-1,01	-0,05	26,9	25,9	27,0
P14069	S100a6	1	-0,85	-0,43	25,1	24,6	25,3
Q6P9P0	Sif2	1	-0,38	-0,51	25,9	25,5	25,5
D3YXK2	Safb	10	-0,13	-0,12	38,3	38,2	38,4
Q9D1Q1	Mphosph 6	1	-0,13	-0,21	25,2	24,9	25,0
Q3TXS7	Psm1	2	-1,02	-0,12	26,8	25,8	26,5
P62830	Rpl23	1			23,0		24,0
P16858	Gapdh	10	-0,30	-0,28	30,3	30,0	30,2
Q8BHS3	Rbm22	2	-0,07	-0,22	31,7	31,6	31,6
P46061	Rangap1	3	-0,22	-0,75	37,9	37,8	37,3
P26350	Ptma	1	-0,01	-0,51	25,3	25,3	25,2
Q8K4B0	Mta1	4	-0,22	-0,42	29,6	29,4	29,4
P84244	H3-3a;H3- 3b	5	0,23	0,49	31,7	32,1	32,4
Q8CAQ8	Immt	1	-0,62	-0,05	26,4	25,6	26,3
Q8BT60	Cpne3	1	-0,15	0,07	25,9	25,7	26,1
Q8R3L8	Cdk8	1	-0,76	-0,40	30,2	29,5	29,8
Q571C7	Bdp1	1	-0,43	0,04	24,6	24,1	24,7
P63276	Rps17	2	-0,77	0,18	25,2	25,1	25,6
Q8BHJ5	Tbl1xr1	1	-0,44	-0,42	26,9	26,4	26,7
Q6W3E0	Caln5	1			23,6	23,4	
P43275	H1-1	2	-0,57	-0,43	25,1	24,7	25,1
F6ZDS4	Tpr	4	-0,57	-0,32	27,2	26,7	27,1
Q80WQ9	Zbed4	1	-0,54	0,16	24,9	24,5	25,1
Q8R349	Cdc16	1	-0,23	0,05	25,5	25,3	25,6
Q6P5B0	Rrp12	1	-0,02	-0,55	25,5	25,5	24,8
Q9D903	Ebna1bp2	1	-0,23	-0,95	26,0	25,8	25,3

Q9D4V4	Taf1d	1	-0,40	-0,28	27,3	27,0	27,2
Q91WM3	Rrp9	3	-0,11	-0,24	27,8	27,6	27,5
E9QA60	Zfp626	1	-0,57	-0,26	26,5	26,1	26,4
E9Q3R9	Zbtb21	4	-0,73	-0,20	31,8	31,1	31,8
Q3TEG0	Btbd8	1	0,97	-2,66	27,7	27,9	26,3
O55135	Eif6	1	-0,09	-0,42	28,7	28,8	28,7
P62267	Rps23	1	-1,06	-0,44	24,3	23,2	23,6
Q99JF8	Psip1	1	-0,12	-0,24	26,5	26,3	26,4
O35426-2	Xbp1	1	-0,71	0,15	29,9	29,1	30,1
Q60864	Stip1	1	-0,34	-0,26	31,4	31,0	31,2
P49452	Cenpc	12	-0,03	-0,91	32,3	32,4	31,7
Q9WTX6	Cul1	1			25,4	24,1	25,4
Q69ZR9	Tasor	2	0,61	-0,87	27,1	28,0	27,5
Q3U1J1	Tfpt	2	-0,61	-0,61	32,8	32,4	32,7
Q9Z2D8	Mbd3	5	-0,42	-0,32	31,7	31,4	31,6
Q923W1	Tgs1	1	-0,38	-0,07	25,7	25,2	25,7
Q66JS6	Eif3j2	2	-0,17	-0,49	26,3	26,0	25,8
P43274	H1-4	8	-0,29	-0,25	30,4	30,1	30,3
Q5XJY5	Arcn1	1	-0,17	-0,34	31,2	30,9	31,0
P21107-2	Tpm3	1	0,00	-0,11	26,5	26,6	26,5
Q61655	Ddx19a	1	-0,33	-0,32	30,5	30,1	30,3
P70696	H2bc1	4	0,38	-0,15	34,6	35,0	34,6
Q61286	Tcf12	2	-0,29	0,30	32,1	31,9	32,5
O88447	Klc1	1	-0,28	-0,11	28,8	28,4	28,7
P61979	Hnrnpk	5	-0,07	-0,27	28,8	28,8	28,7
P62908	Rps3	2	-0,36	-0,09	28,4	28,0	28,4
P37913	Lig1	4	-0,33	0,37	32,3	31,9	32,8
Q6PCM2	Ints6	1	-0,42	-0,02	30,5	30,1	30,6
P59941	Sirt6	2	-0,06	-0,51	29,2	29,2	28,9
P14685	Psmd3	1	-0,58	-0,26	26,7	26,3	26,6
Q8VDW0	Ddx39a	1			25,0	24,9	
P62878	Rbx1	1	-0,19	-0,40	26,8	26,8	26,7
Q8R0X7	Sgpl1	1	-0,67	0,04	24,7	24,1	24,7
P63154	Crnkl1	1	0,20	-1,05	24,5	24,8	23,9
Q1HFZ0	Nsun2	1	-0,27	-0,31	27,1	26,8	26,9
Q9CX34	Sugt1	1	-0,31	-0,12	27,5	27,2	27,5
Q80U93	Nup214	2	-0,23	-0,12	29,3	28,9	29,2
P15864	H1-2	4	-0,34	-0,22	29,0	28,7	28,9
Q9QY06	Myo9b	1	-0,51	-0,98	27,3	27,2	26,7
Q9D0E1	Hnrnpm	2	-0,35	-0,28	31,7	31,4	31,6
C0HKE2	Hist1h2ac	4	-0,64	-0,49	34,0	33,6	33,7
Q6P9Q3	Zbtb26	1	0,02	-0,75	25,2	25,2	24,9
Q9JI13	Utp3	2	0,03	-0,43	26,5	26,6	26,2
Q8R2N2	Utp4	1	-0,34	-0,82	27,5	27,1	26,8
POC0S6	H2az1	3	-0,72	-0,15	30,3	29,6	30,2

Q922D4	Ppp6r3	1			24,0		22,0
P17918	Pcna	2	-0,45	-0,37	37,6	37,0	37,2
Q6PDK2	Kmt2d	4	-0,46	-0,12	29,8	29,3	29,9
P59110	Senp1	2	-1,13	0,19	27,2	26,2	27,6
P63038	Hspd1	1	-0,83	-0,58	25,9	25,0	25,4
Q99LT0	Dpy30	1	-0,93	-0,53	25,7	25,1	25,3
Q9CZT6	Cmss1	1	-0,28	-0,07	27,5	27,3	27,5
Q9JJ59	Abcb9	1	-0,26	-0,21	30,5	30,2	30,4
Q8VDF2	Uhrf1	4	-0,49	0,02	31,8	31,3	31,9
E9Q3G8	Nup153	2	-0,16	-0,38	30,7	30,6	30,4
Q6NZB0	Dnajc8	1	-0,27	-0,97	26,8	26,3	25,8
Q99NA9	Pcgf6	1	-0,19	0,12	29,2	29,0	29,4
Q6DFW4	Nop58	9	-0,14	-0,40	33,4	33,3	33,1
P47915	Rpl29	4	-0,43	-0,38	27,3	26,9	27,0
P62301	Rps13	1	-0,45	-0,09	25,8	25,4	25,9
P52480	Pkm	10	-0,34	-0,10	30,7	30,4	30,7
P60710	Actb	6	-0,57	-0,31	32,7	32,2	32,6
Q8CHI8	Ep400	10	-0,84	0,26	31,4	30,6	31,8
Q8VCY6	Utp6	2	-0,85	-0,85	26,1	25,1	25,3
Q8CIM8	Ints4	3	-0,26	-0,12	35,2	35,0	35,3
P30416	Fkbp4	2	2,95	-0,82	26,8	28,7	27,3
P68369	Tuba1a	5	-0,73	-0,37	29,7	28,9	29,4
P06151	Ldha	4	-0,74	-0,32	28,6	27,9	28,4
Q9D8W5	Psmc12	1	0,70	1,62	30,4	31,2	32,2
Q9DB00	Gon4l	1	-0,68	-0,19	25,7	25,1	25,6
Q6A0A9	FAM120A	1	-0,66	-0,09	27,4	26,7	27,3
P35293	Rab18	2	-0,13	-0,69	28,2	27,9	27,5
P12970	Rpl7a	7	-0,74	-0,20	29,8	29,0	29,8
Q8BRB7	Kat6b	2	-1,02	0,15	29,6	28,6	30,0
Q8VDJ3	Hdlbp	1	-0,99	-0,92	25,0	24,4	24,4
Q9CZM2	Rpl15	1	-1,75	-0,80	26,6	25,6	26,4
Q6PDI5	Ecpas	1	-0,64	0,10	27,6	26,7	27,4
Q8K114	Ints9	1	-0,26	-0,32	34,2	34,0	34,0
Q9CY50	Ssr1	2	-1,19	-0,62	27,9	26,8	27,4
Q6NS46	Pdcd11	4	0,23	-0,59	31,0	31,1	30,6
P97351	Rps3a	5	-0,18	-0,66	30,3	29,7	29,6
Q99P72	Rtn4	4	-0,31	-0,08	29,5	29,2	29,5
Q6ZQL4	Wdr43	5	-0,20	-0,63	29,2	28,9	28,7
Q6P1E7	Primpol	1	-0,25	-0,17	25,8	25,5	25,8
Q9QUM9	Psma6	2	-0,39	-0,31	27,2	26,9	27,0
Q9CRB2	Nhp2	2	-0,30	-0,19	30,1	29,7	29,9
B1AUN2	Eif2b3	1	-0,52	-0,25	26,8	26,3	26,6
Q5SSW2	Psme4	1	0,12	-0,13	28,2	28,4	28,2
Q8C7V3	Utp15	3	-0,39	-0,37	29,3	29,0	29,1
O70445	Bard1	1	-0,86	-0,22	25,2	24,2	24,5

P59325	Eif5	1	-0,48	-0,15	26,8	26,4	26,6
Q9QZM0	Ubqln2	1	-1,12	-0,35	25,3	24,2	25,2
Q497V6	Bahd1	1	-0,61	-0,55	27,3	26,8	27,2
P09055	Itgb1	1	-0,49	-0,11	26,6	26,1	26,6
Q9QY84	Actl7a	1	-0,28	-0,26	30,0	29,6	29,7
P06537	Nr3c1	2	-0,28	-0,23	29,7	29,4	29,5
P70460	Vasp	2	0,05	-1,62	26,4	26,3	24,9
Q9JLV5	Cul3	1	-0,40	-0,38	28,5	28,1	28,2
Q91WG4	Elp2	1	-0,50	-0,16	28,1	27,4	27,8
Q3TCX3	Khdc4	1	-0,17	-0,22	25,7	25,6	25,6
P56960	Exosc10	6	-0,12	-0,29	33,0	32,8	32,8
P61255	Rpl26	2	-0,56	-0,20	27,3	26,8	27,2
Q8BJ37	Tdp1	1	-1,12	-0,32	29,7	29,1	29,5
E9QAE3	Btaf1	2	-1,03	-0,99	25,1	24,3	24,3
P70351	Ezh1	1	-0,16	-0,81	27,8	27,5	27,2
Q9QXK3	Copg2	1	-0,78	-0,89	25,9	25,2	25,3
Q8BP71	Rbfox2	1	0,03	-0,62	27,6	27,6	27,3
Q6NSQ5	Sp140	4	-0,47	-0,49	28,5	28,2	28,3
Q8COP7	Znf451	22	-0,13	-0,26	36,4	36,3	36,3
Q9D0T1	Snu13	1	-1,25	-1,87	25,7	24,7	24,4
Q9QWF0	Chaf1a	9	-0,60	-0,13	31,5	30,8	31,4
Q8BV16	Zfp398	2	-1,51	-0,64	26,8	26,0	26,3
Q9Z2E1	Mbd2	5	-0,44	-0,32	31,4	31,1	31,3
Q6ZPY7	Kdm3b	3			22,4	24,4	25,0
Q9ES46	Parvb	1	-1,00	0,30	27,0	26,4	27,1
P35601	Rfc1	1	-0,92	-0,42	28,6	27,6	28,4
Q9JHJ0	Tmod3	1	-0,77	-2,27	25,8	25,1	
Q9ES28	Arhgef7	1	-1,47	-1,15	25,7	24,2	25,2
Q9Z160	Cog1	1	-0,96	0,11	24,2	23,8	24,7
Q8VHM5	Hnrnpr	2	-0,22	-0,30	31,3	31,2	31,1
Q3TDQ1	Stt3b	1	-0,49	-2,22	29,1	28,6	28,4
Q9D384	Snrnp35	1	-0,30	-0,81	29,6	29,4	29,0
Q0P678	Zc3h18	2	0,03	-1,04	26,7	26,7	26,5
Q80UV9	Taf1	4	-0,85	-0,16	31,1	30,4	31,1
P11103	Parp1	4	-0,41	0,06	33,4	33,0	33,6
Q8R344	Ccdc12	1	-0,08	-0,86	28,0	27,9	27,7
O08759	Ube3a	1	-2,11	0,07	25,8	24,4	26,0
P17095	Hmga1	1	-0,40	-0,19	26,9	26,6	26,8
Q8R3N1	Nop14	2	-0,35	-1,07	28,6	28,5	28,2
B1AWC9	Pde4b	1	-0,09	-1,24	26,7	26,7	26,2
Q8VEE4	Rpa1	1	-1,56	-0,89	25,7	24,0	25,1
Q6ZQ58	Larp1	2	-0,58	-0,30	30,6	30,2	30,4
Q9Z104	Hmg20b	1	-0,37	-0,11	27,3	26,9	27,3
Q3UQN2	Fcho2	1	-0,87	-0,11	30,7	29,9	30,7
Q8C4J7	Tbl3	1	-0,59	-0,67	27,4	26,9	26,9

A2AHC3	Camsap1	1	-0,40	-0,53	24,3	23,7	23,8
Q923D5	Wbp11	2	-0,79	-0,29	27,8	27,0	27,5
Q9CPQ3	Tomm22	1	-0,66	-0,19	28,1	27,5	28,1
Q5DTI6	Kansl1l	3	-0,77	-0,04	30,2	29,5	30,3
O35451	Atf6b	1	-0,94	-0,10	23,9	22,0	24,0
Q8C6L5	Cgas	1	0,32	-0,05	27,2	27,4	27,2
Q9D6Z1	Nop56	7	-0,54	-0,56	30,3	29,9	29,9
Q5SXJ3	Brip1	2	-1,27	0,34	27,3	25,6	27,4
Q9DBF1	Aldh7a1	1	0,17	-1,00	25,0	25,2	22,8
Q7TMK9	Syncrip	2	-0,44	-0,27	27,7	27,2	27,5
P61957	Sumo2	7	-0,33	-0,33	38,4	38,0	38,2
Q923B3	Nrif1	2	-0,89	-0,22	28,5	27,7	28,4
Q6EJB6	Utp14b	1	-0,06	-0,50	26,4	25,3	25,0
Q6NZJ6	Eif4g1	2	-1,72	-1,69	25,9	24,5	24,6
E9PZJ8	Ascc3	1	-0,34	-0,49	26,1	25,8	25,7
Q8C156	Ncaph	1			22,5		22,8
Q8K2A7	Ints10	2	-0,58	-1,07	28,2	27,7	27,3
Q62393-2	Tpd52	1	-0,14	-1,48	27,6	27,4	26,8
Q3UBG2	Pid1	1	-0,50	-0,34	27,2	26,7	27,0
Q9ERU9	Ranbp2	29	-0,35	-0,12	35,0	34,5	35,0
Q6ZQ03	Fnbp4	2	-0,32	-0,27	30,3	30,0	30,2
Q60591	Nfatc2	3	-0,91	0,17	34,3	33,4	34,7
P32067	Ssb	1	-1,02	-1,28	28,3	27,2	27,2
E9Q5C9	Nolc1	6	-0,42	-0,64	32,9	32,6	32,5
P27659	Rpl3	1	-0,48	-2,38	30,2	29,8	29,4
Q9CQJ4	Rnf2	2	-0,60	-0,58	28,6	28,2	28,3
Q61024	Asns	1	-0,22	-0,20	31,2	31,0	31,2
Q62311	Taf6	3	-0,72	-0,41	28,5	27,9	28,2
Q8C8T8	Tsr2	1	-0,82	-0,25	24,2	23,7	24,3
P59470	Polr3b	1			27,2	27,9	26,4
Q61216	Mre11	1	-0,45	-0,17	33,1	32,6	33,0
Q9CPR4	Rpl17	2	-0,42	-0,28	28,1	27,7	27,9
E9PZ68	Zfp788	1	-0,40	-0,62	27,4	27,3	27,3
Q5SXY1	Specc1	1	-0,37	-0,24	28,3	28,0	28,2
A0A0R4J1 F8	Wdhd1	1	-0,89	-0,15	30,4	29,5	30,4
Q8QZY9	Sf3b4	1	-0,33	-0,60	29,9	29,6	29,4
Q8BG32	Psm11	1	-0,62	-0,44	29,6	29,0	29,2
Q8BSP2	Ncaph2	3	-1,67	-0,35	30,5	28,9	30,7
Q9Z2Y8	Plpbp	1	-0,44	-1,35	25,0	24,5	23,4
Q3UHB8	Ccdc177	1	-0,65	-1,04	25,4	25,3	25,1
Q8CGP5	Hist1h2af	1	-0,24	-0,67	24,7	24,5	24,1
Q6NZN1	Pprc1	1	-2,48	-0,22	25,9	22,4	25,7
Q8BVY4	Supt3	4	-0,95	-0,06	31,9	31,0	32,0
Q5U5Q9	Uimc1	4	-1,45	-1,66	29,0	27,8	27,5

F6R9A8	Zfp958	1	-1,18	-1,51	24,5	23,5	22,1
Q64012	Raly	5	-0,34	-0,71	32,0	31,7	31,5
P15806	Tcf3	2	-1,38	-1,22	28,9	27,4	28,1
Q62426	Cstb	2	-1,23	-0,04	30,6	30,4	30,6
P48036	Anxa5	2	-0,93	-0,25	31,4	30,5	31,2
Q9JL18	Sart3	1	-0,13	-2,19	26,6	26,5	24,6
O55142	Rpl35a	1	-0,29	-0,84	26,7	26,5	26,4
Q9D168	Ints12	1	-1,40	-0,14	26,8	26,2	26,8
Q6DFV1	Ncapg2	3	-1,07	0,34	33,7	32,7	34,3
P62960	Ybx1	1	-0,37	-0,45	27,8	27,4	27,4
Q5SVR0	Tbc1d9b	1	-1,10	-0,69	26,0	24,8	26,1
Q9D0N7	Chaf1b	3	-1,14	-0,73	27,7	26,5	27,1
Q80Y84	Kdm5b	4	-0,58	-0,92	31,3	30,9	30,8
P42932	Cct8	5	-0,32	-0,29	31,2	30,9	31,1
Q01320	Top2a	34	-0,32	-0,58	37,0	36,7	36,7
A2A7U2	Zmym6	1	-1,24	-0,31	25,7	24,7	25,5
Q3UUVO	Ciz1	6	-0,63	-0,24	29,5	28,9	29,4
P07903	Ercc1	1	-1,95	-1,17	25,4		24,4
Q9Z277	Baz1b	14	-0,40	-0,45	32,9	32,5	32,6
Q5XG71	Utp20	5	-0,66	-1,24	29,4	28,6	28,4
Q8BHK9	Ercc6l	1	-1,84	0,37	26,6	24,9	27,1
P25444	Rps2	2	-0,29	-1,20	30,9	30,8	29,9
O08547	Sec22b	1	-0,37	-0,18	33,1	32,7	33,0
Q91WA1	Tipin	1	-0,82	-0,06	26,7	25,9	26,7
Q62481	Vps72	3	-0,90	-0,05	31,2	30,3	31,2
Q9Z2Q2	Knop1	1	-0,63	0,11	27,7	27,1	27,7
Q6PGF5	Bms1	6	-0,37	-0,67	32,7	32,3	32,1
P97329	Kif20a	1	-0,04	-0,60	28,0	28,0	27,5
Q9QY01	Ulk2	1	-0,17	-1,45	25,3	25,1	22,9
Q9EQB9	Znf287	4	-0,50	-0,78	27,5	27,1	26,9
Q80VJ2	Sra1	1	-0,27	-0,15	23,2	22,9	22,7
Q9CQX4	Pclaf	6	-0,58	-0,60	31,9	31,3	31,4
Q8CGP1	H2bc12	4	-0,35	-0,32	31,7	31,4	31,5
O08696	Foxm1	3	-1,34	-0,05	29,9	28,5	29,9
Q9QXG9	Tinf2	2	-0,86	-1,65	26,3	25,7	24,0
Q9WTM5	Ruvbl2	3	-0,79	-0,01	34,8	34,0	34,9
Q3V3Q7	Pacs2	1	-1,07	-0,41	26,0	25,1	25,6
Q8BTY2	Slc4a7	1	-0,66	-0,39	25,9	25,3	25,7
Q8BU04	Ubr7	3	-0,77	-0,62	30,7	30,0	30,2
Q8BVK9	Sp110	7	-0,37	-0,63	30,8	30,5	30,3
Q8C4M7	Cenpu	2	-2,80	-1,14	27,2	24,7	26,6
P16374	Zfp60	1	-0,42	-0,63	27,1	26,8	26,6
Q9CZW5	Tomm70	1	-0,82	-0,47	25,6	24,7	25,4
E9Q2I4	Elmsan1	1	-2,04	-1,34	25,0	21,6	23,4
Q9JHS9	Cwc15	1	-2,05	0,07	26,0	25,2	26,2

Q9CY58	Serbp1	5	-0,64	-0,38	32,2	31,5	31,9
Q61858	Gpank1	1	-0,44	-0,60	26,4	26,0	26,0
P25799	Nfkb1	2	-0,37	-0,32	29,8	29,5	29,6
Q60817	Naca	1	-0,65	-0,30	27,9	27,3	27,7
Q9QWH1	Phc2	1	-1,61	-0,06	26,3	25,6	26,3
Q9EQ28	Pold3	2	-0,99	-0,17	29,4	28,5	29,4
Q7TSIO	Znf12	1	-0,70	-0,64	25,6	25,1	25,1
AOA571B DQ7	1810020 O05Rik	1	-0,80	-0,44	31,3	30,9	30,9
Q3UTB2	A630001 G21Rik	3	-0,51	-0,91	29,3	28,9	28,6
Q8BQR4	Kansl2	1	-1,29	-0,12	31,1	29,9	31,1
Q8BZIO	Afap111	1	-0,17	-1,23	28,7	28,5	28,0
Q8BG81	Poldip3	2	-1,03	-2,78	26,0	25,4	22,5
Q8R2S9	Actr8	1	-0,97	-0,74	30,0	29,1	29,5
Q8C0I4	Epc2	9	-0,78	-0,18	33,0	32,3	33,0
Q9CZU3	Mtrex	3	-0,90	-2,76	28,4	27,5	26,6
P13864	Dnmt1	19	-0,64	-0,13	34,6	33,9	34,6
Q0GNC1	Inf2	1	-1,58	-0,31	24,5	22,5	24,2
Q80YV3	Trrap	11	-1,10	-0,38	34,9	33,8	34,7
Q6ZQA0	Nbeal2	1	-0,95	-0,36	25,7	24,9	25,4
Q8K4J6	Mrtfa	2	-1,61	-2,12	28,7	27,0	27,1
P38533	Hsf2	1	-0,56	-0,54	32,5	31,8	32,0
Q6PD21	Shb	1	-0,87	-0,80	24,7	23,3	23,6
Q91XU0	Wrnip1	1	-1,26	-0,45	25,7	24,7	25,5
B0V2W4	Zfp952	1	-0,41	-1,22	25,1	24,7	24,2
B2RWS6	Ep300	2	-2,29	-0,90	27,7	26,4	26,9
E9Q616	Ahnak	42	-0,52	-0,43	34,3	33,7	33,9
Q61335	Bcap31	2	-0,72	-1,14	29,8	29,1	29,2
Q4QY64	Atad5	5	-0,74	-0,35	30,5	29,7	30,3
Q9JI44	Dmap1	5	-1,48	-0,25	34,4	33,1	34,3
Q91VL8	Terf2ip	1	-2,04	-1,39	27,2	25,1	26,5
Q9Z204	Hnrnpc	12	-0,38	-0,51	37,9	37,6	37,7
G3X9B1	Heatr1	11	-0,50	-1,38	33,2	32,7	32,0
Q6PDM2	Srsf1	2	-0,47	-0,25	28,2	27,8	28,1
P33609	Pola1	1	-1,91	-0,62	28,0	26,1	27,5
Q9JIH2	Nup50	2	-0,61	-0,48	31,6	31,0	31,3
Q8R4Z4	Etv3	1	-1,74	-0,29	27,3	25,7	27,1
P19426	Nelfe	1	-0,77	-0,90	26,5	25,9	25,9
Q61221	Hif1a	1	-1,71	-0,21	27,0	25,2	26,9
Q9WTX8	Mad111	1	-0,56	-0,54	29,5	28,9	29,0
Q99PP2	Znf318	6	-0,99	-0,51	30,1	29,2	29,8
Q8C9M8	Zfp446	3	-0,43	-0,94	32,5	32,0	31,7
P16951	Atf2	1	-1,28	-0,60	26,1	24,8	25,7
Q7TPN9	Prr14	1	-2,91	-0,58	25,3		25,2

E9PZQ0	Ryr1	1	-1,42	-0,62	29,5	28,5	29,7
Q99LM3	Smtnl1	1	-1,44	-1,38	28,6	27,7	26,9
P60122	Ruvbl1	3	-1,22	-0,60	32,0	30,8	31,5
Q8R2M2	Dnttip2	13	-0,42	-1,12	31,7	31,2	30,6
Q9CYX7	Rrp15	1	-0,84	-0,84	29,0	28,1	28,3
E9Q2S6	Zfp780b	1	-0,42	-1,48	29,3	28,9	28,5
Q8C3J5	Dock2	2	-1,95	-1,73	28,8	26,8	27,1
Q8K4S1	Plce1	1	-0,52	-1,29	26,1	25,5	24,8
Q7TQK1	Ints7	2	-0,77	-1,17	29,7	28,9	28,7
Q7TNK4	Zfp397	11	-0,48	-0,99	33,3	32,9	32,4
Q8CDZ2	Mettl21e	1	-1,56	-0,81	29,5	28,9	29,2
Q6PG04	Ccdc82	1	-0,88	-1,13	26,1	25,2	25,0
B2KF05	Brpf3	1	-1,08	-3,65	27,5	27,1	25,7
Q7TNL5	Ppp2r5d	1	-1,87	-2,06	28,8	27,8	27,3
P54754	Ephb3	1	-2,80	-1,66	28,3	26,2	27,1
O55187	Cbx4	1	-1,29	-1,53	27,7	26,4	26,5
P86174	Bend4	1	-2,22	-1,87	25,1	22,1	23,8
Q9DA19	Cir1	2	-0,42	-0,43	28,5	28,1	28,2
Q8VDZ4	Zdhhc5	1	-1,59	-1,96	26,6	25,5	24,7
Q99J62	Rfc4	2	-3,53	-1,46	27,1	23,5	26,1
Q91WG2	Rabep2	1			30,5	31,1	28,8
Q9ERE7	Mesd	2				27,7	
P11590	Mup4	1			27,3	27,6	27,7
Q8BVN0	Ccdc122	1			26,7	27,0	25,3
D3YYY8	Arhgef26	1			27,3	26,8	28,6
G3UW68	Gm9376	1			26,9	26,7	26,9
P10639	Txn	1				26,2	21,7
P60897	Sem1	1			26,2	25,8	25,9
Q5RJY2	G2e3	1			25,6	25,8	26,0
B1AQJ2	Usp36	1			23,4	25,7	25,8
Q6IE82	Jade3	1			27,4	25,6	30,2
Q8BZ05	Arap2	1			29,1	25,5	
Q7TPD1	Fbxo11	1			24,2	25,2	24,5
P84099	Rpl19	1			25,3	25,2	25,3
Q9D7P9	Serpinb12	1				25,1	
P55849	Dsc1	1			24,6	24,9	24,1
Q9JM05	Pias4	2			25,0	24,8	24,9
P83741	Wnk1	1			24,2	24,6	27,5
Q6X1Y6	Asic3	1			24,8	24,5	26,0
A2AI76	Klhl34	1			25,5	24,5	24,7
Q9QXX8	Nufip1	1			24,8	24,5	24,3
Q80UF4	Sdccag8	1			24,9	24,5	25,2
E9Q4X2	Uggt2	1				24,5	24,0
A0PK57	Olf1436	1				24,5	26,6
E9PYB0	Ahnak2	2			25,0	24,4	25,0

C0HKD8	Mfap1a	1			25,3	24,2	24,9
O89091	Klf10	1			23,8	24,2	23,0
D3Z482	Ankrd26	1			25,7	24,2	25,5
Q8VDS8	Stx18	1			25,3	24,1	
Q2MKA5	Chrna5	1			26,8	24,1	26,6
Q9DAZ9	Zfyve19	1				23,8	24,2
Q9D0F1	Ndc80	1			23,3	23,8	24,7
Q3U155	Ccdc174	1			27,4	23,7	26,8
Q9DAU9	Znf654	1			23,0	23,7	21,9
Q6DID5	Pwwp3a	1			23,8	23,7	23,7
P62307	Snrpf	1			23,8	23,6	
Q9QYG0	Ndrp2	1			24,7	23,6	25,1
B2KFW1	Zscan20	1				23,6	20,9
Q9D2Y4	Mkl1	1			24,6	23,5	24,5
Q6ZWW7	Rpl35	1			24,9	23,4	24,4
Q9JLV6	Pnkp	1			24,1	23,3	23,4
Q6P7W0	Senp6	1				23,3	23,0
Q9QY76	Vapb	2			23,4	23,2	25,5
O70472	Tmem131	1			23,8	23,2	24,7
Q3TWH3	Pnrc1	1				22,8	
Q9QYM8	Cenph	1			21,1	22,7	21,7
P57787	Slc16a3	1			24,1	22,7	22,1
Q8K2K6	Agfg1	1			23,2	22,6	22,3
P17717	Ugt2b17	1				22,6	23,8
Q9DAW6	Prpf4	1			23,7	22,6	23,8
Q3TYX8	Rufy4	1			23,9	22,5	24,3
Q80UK8	Ints2	1				22,2	24,5
Q80WC1	Ubn2	1			22,5	22,1	22,5
Q8CHC4	Synj1	1			22,6	21,9	
Q99KB8	Hagh	1				21,7	24,5
G5E8B9	Zbtb11	1			20,6	21,4	22,2
A0A1B0G SI5	Gm33543	1			26,6		25,9
A2A8M8	Pramef6	1			22,9		
Q922B9	Itprid2	1					24,5
Q5HZG4	Taf3	1			22,0		23,2
E9PWG6	Ncapg	1			24,2		23,4
E9Q7N9	Dnah11	1					26,3
Q8K2H1	Pphln1	1					
Q8R0K4	Ccdc137	1			23,2		
Q3UVC0	Ksr2	1			27,4		24,7
P10711	Tcea1	2			24,5		25,3
P97857	Adamts1	1			24,3		
Q8BRK9	Man2a2	1					
Q3UH85	Nol4l	1					

Q3UMB5	Smcr8	1			21,5		23,3
Q5U4C3	Scaf1	1			22,4		
Q69ZK5	Klhl14	1					24,9
Q6PGL7	Washc2	1			23,6		23,5
Q6ZPI3	Lcor	1			24,2		20,7
Q8BG30	Nelfa	1			22,4		21,8
Q8BQC8	Rbak	1					23,7
Q8CJ27	Aspm	1					22,6
Q91VJ1	Aim2	1					24,6
Q99MA9	Nkx6-1	1					
Q9D3S9	Cpvl	1					
Q9JLB2	Mpp5	1					26,2
Q9JLQ0	Cd2ap	1					24,3
E9QME3	Nsl1	1					

Rôle chromatinien de SUMO dans l'immunité innée et ses implications dans l'immunothérapie des cancers

Résumé :

L'immunothérapie, et plus particulièrement la thérapie par blocage des points de contrôle, est récemment apparue comme une approche prometteuse pour le traitement du cancer. Cependant, bien que des résultats remarquables soient observés sur un large panel de tumeurs, cela ne profite qu'à un nombre limité de patients. Une étude réalisée au laboratoire a montré que la perte de SUMOylation dans les cellules immunitaires induit une réponse massive d'interféron de type I (IFN-I) par dérégulation des éléments régulateurs distaux du gène *Ifnb*. De plus, il a été récemment découvert que les réponses innées induites par l'IFN-I agissaient en synergie avec la thérapie par blocage des points de contrôle pour induire un rejet tumoral. Ma thèse a donc pour objectif d'étudier l'effet de la manipulation de la voie SUMO sur les réponses immunitaires anti-tumorales. Mes résultats montrent que les souris déficientes en *Ubc9*, l'enzyme de conjugaison E2 unique de la voie SUMO, présentent un retard significatif de la croissance tumorale lors du blocage de PD-1 par rapport à leurs congénères WT. Des expériences similaires sur des souris IFNAR KO montrent l'implication au moins partielle de cette réponse à la signalisation IFN-I. De plus, nous avons conçu un panel de FACS de 17 couleurs afin d'étudier les populations immunitaires dans la rate, les ganglions lymphatiques et la tumeur, qui a montré des différences significatives entre les souris *Ubc9^{+/-}* et *Ubc9^{+/+}*. Afin de découvrir les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la fonction de SUMO dans l'immunité innée, nous avons employé une méthode de spectrométrie de masse qui permet l'identification de répertoire de substrats endogènes de SUMO (SUMOylomes) dans les macrophages non-stimulés ou lors de stimuli pathogènes. Au total, 1232 substrats de SUMO ont été identifiés, dont 30 différemment SUMOylés lors de stimuli immunitaires. La validation et la caractérisation fonctionnelle de ces protéines donnent un aperçu du mécanisme par lequel SUMO régule l'immunité. De plus, l'équipe de Dejean a démontré récemment que SUMO agit au niveau de la chromatine et fonctionne comme un régulateur général de l'identité cellulaire. Dans ce contexte, une autre partie de mon projet vise à évaluer la fonction de la SUMOylation dans un processus physiopathologique associé aux changements de destin cellulaire. Plus précisément, nous avons étudié le rôle de SUMO dans la régénération musculaire. En utilisant un modèle bien défini de régénération cellulaire qu'est le système musculaire squelettique, nous avons montré que l'hypoSUMOylation semble améliorer le processus de régénération. Nous espérons que ces études fourniront de nouvelles informations sur les fonctions de SUMO dans la régénération tissulaire et permettront l'identification de nouvelles stratégies de manipulation de l'inflammation à des fins thérapeutiques contre le cancer.

Chromatin role of SUMO in innate immunity and its implications in cancer immunotherapy

Abstract:

Immunotherapy, and more specifically immune check point blockade, has recently emerged as a promising approach for cancer treatment. However, although impressive responses are observed in a broad panel of tumor types, it only benefits to a limited number of patients. Previous analysis in the lab had shown that loss of SUMOylation in immune cells induces a massive type I interferon (IFN-I) response through derepression of distal regulatory elements of the *Ifnb* gene. Moreover, IFN-I-based innate responses were recently found to synergize with checkpoint blockade for the rejection of established tumors. The aim of my thesis was thus to investigate the effect of manipulating the SUMO pathway on anti-tumor immune responses. My results show that mice haploinsufficient for *Ubc9*, the unique E2 conjugating enzyme of the SUMO pathway, show a significant delay in tumor growth upon PD-1 blockade as compared to their WT littermates. Similar experiments in IFNAR KO mice shows the partly dependency of this response on IFN-I signaling. Moreover, we designed a 17-colors FACS panel to study immune cell populations in the spleen, lymph nodes and tumors, which showed significant differences between *Ubc9^{+/-}* and *Ubc9^{+/+}* mice. To uncover the molecular mechanisms underlying the function of SUMO in innate immunity, we launched an unbiased mass-spectrometry approach to identify the repertoire of endogenous SUMO substrates (SUMOylomes) in macrophages either unstimulated or upon pathogenic stimuli. In total, 1232 substrates of SUMO were identified, 30 of which were differentially SUMOylated upon immune stimuli. Validation and functional characterization of these substrates give some insight into the mechanism by which SUMO regulates immunity. Moreover, Dejean's team demonstrated recently that SUMO acts at the chromatin and functions as a general safeguard of cell identity. In this context, another part of my project seeks to assess the function of SUMOylation in a patho-physiological process associated with cell fate changes. More precisely, we studied the role of SUMO in muscle regeneration. Using a well-defined model of cellular regeneration that is the skeletal muscle system, we have shown that hypoSUMOylation seems to improve the regeneration process. We anticipate these studies to provide significant new insight into SUMO functions involved in the tissue regeneration as well as to allow the identification of new potential strategies to manipulate inflammation for cancer therapeutic purposes.