



**HAL**  
open science

# Implication du processus de sumoylation/désumoylation dans la régulation de l'activité du récepteur ER $\alpha$

Amandine Philippat

► **To cite this version:**

Amandine Philippat. Implication du processus de sumoylation/désumoylation dans la régulation de l'activité du récepteur ER $\alpha$  : Inter-relation phosphorylation et sumoylation du récepteur RXR $\alpha$ . Biologie cellulaire. 2011. hal-01478899

**HAL Id: hal-01478899**

**<https://ephe.hal.science/hal-01478899>**

Submitted on 28 Feb 2017

**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.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MÉMOIRE**

**Présenté**

**par :**

**PHILIPPAT Amandine**

**Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études**

**Implication du processus de sumoylation/désomoylation dans la régulation de l'activité  
du récepteur ER $\alpha$ .**

**Inter-relation phosphorylation et sumoylation du récepteur RXR $\alpha$ .**

**Soutenu devant le jury suivant le 21 novembre 2011 :**

<b>Mr RONOT Xavier</b>	<b>– Président</b>
<b>Mme SENTIS Stéphanie</b>	<b>– Tuteur scientifique</b>
<b>Mr EXBRAYAT Jean-Marie</b>	<b>– Tuteur pédagogique</b>
<b>Mr JALAGUIER Stephan</b>	<b>– Rapporteur</b>
<b>Mr MORLE François</b>	<b>– Examineur</b>
<b>Mme CORBO Laura</b>	<b>– Examineur</b>

**Mémoire préparé sous la direction de :**

**Madame le Docteur Stéphanie SENTIS,  
stephanie.sentis@lyon.univcancer.fr  
Laboratoire INSERM U590  
Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec  
69373 Lyon Cedex 08  
Directeur Alain Puisieux**

**Et de :**

**Monsieur le Professeur Jean-Marie EXBRAYAT,  
jmexbrayat@univcatholyon.fr  
Laboratoire de Biologie Générale  
Université catholique de Lyon  
25 rue du plat, 69002 Lyon**

# ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

## Implication du processus de sumoylation/désomoylation dans la régulation de l'activité du récepteur ER $\alpha$ .

### Inter-relation phosphorylation et sumoylation du récepteur RXR $\alpha$ .

**PHILIPPAT Amandine**

#### **Résumé :**

La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui se retrouve au centre de nombreux processus cellulaires tels que la régulation transcriptionnelle, le cycle cellulaire, la structure de la chromatine, l'intégrité du génome, la différenciation et la localisation cellulaire. Elle agit également de manière positive ou négative sur la stabilité des protéines. Il a été démontré que de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes sont sumoylés et qu'une dérégulation de ce processus est observée dans de nombreux cancers, dont le cancer du sein où il a été noté une augmentation de l'expression de l'enzyme de conjugaison UBC9 ainsi que de l'enzyme de ligation PIAS3 et une diminution de l'expression de la désomoylase SENP6.

Plusieurs récepteurs nucléaires sont les cibles de la sumoylation. Leur sumoylation induit une diminution de leur activité transcriptionnelle, elle est hormono-dépendante.

Il existe de nombreuses inter-relations entre la sumoylation et les autres modifications post-traductionnelles, qui peuvent être positives comme négatives. Ces inter-relations régulent le processus de sumoylation. Dans nos travaux, nous avons mis en évidence une inter-relation entre la sumoylation et la phosphorylation du récepteur RXR $\alpha$ .

En effet, nous avons démontré d'une part que l'acide rétinoïque stimule la sumoylation de mRXR sur sa lysine 113 et d'autre part que la phosphorylation de RXR sur ses résidus S61, S85, T87 et S265 inhibe sa sumoylation.

Les récepteurs nucléaires ainsi que leurs corégulateurs sont sumoylés. L'équilibre entre sumoylation et désomoylation est donc important : une dérégulation dans ce processus aurait des répercussions sur leur l'activité transcriptionnelle et donc sur la transcription des gènes cibles. Nous avons donc étudié l'implication du processus de sumoylation/désomoylation dans la régulation de l'activité de ER. Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que ER $\alpha$  est sumoylé sur ses lysines 266, 268, 299, 302 et 303 de manière ligand dépendante par les SUMO-E3 ligases de la famille PIAS. Au cours de mon stage EPHE, nous avons montré que SENP1 et SENP2 sont les désomoylases de ER $\alpha$ . Ces désomoylases, même mutées sur leur site catalytique, répriment l'activité transcriptionnelle du récepteur. Nous avons ensuite mis en évidence que SENP2 inhibe la transcription oestrogéno-régulée de PR et de PS2, que son domaine N-terminal contient un domaine répresseur intrinsèque qui interagit avec la région charnière de ER $\alpha$ .

L'ensemble des mes travaux a ont donc permis de mettre en évidence que la phosphorylation inhibait la sumoylation de RXR $\alpha$ , et que SENP1 et 2 étaient les désomoylases de ER $\alpha$ .

**Mots clés :** ER $\alpha$ , RXR $\alpha$ , modifications post-traductionnelles, sumoylation, cancer du sein.

## Sommaire

Abréviations	4
Introduction	6
<u>I. La Sumoylation</u>	9
<u>I-1 La famille SUMO</u>	9
<u>I-2 Conjugaison de SUMO sur les protéines cibles:</u>	11
<u>I-2-1 Principales étapes du processus de sumoylation</u>	11
<u>I-2-2: Site consensus de sumoylation</u>	14
<u>I-2-3 Etat de sumoylation des protéines</u>	14
<u>I-3 Clivage entre SUMO et son substrat: la désomoylation</u>	15
<u>I-3-1 Mécanisme de désomoylation</u>	15
<u>I-3-2 Les désomoylases :</u>	16
<u>I-4 Conséquences moléculaires de la sumoylation</u>	20
<u>I-4-1 Généralités</u>	20
<u>I-4-2 Partenairesprotéiques de la protéine sumoylée interagissants avec SUMO : implication des motifs SIM</u>	21
<u>I-5 Conséquences fonctionnelles de la sumoylation</u>	23
<u>I-5-1 Impact fonctionnel de la sumoylation des protéines</u>	23
<u>I-5-2 Impact KO enzymes sumoylation : conséquences physiologiques et importance du processus de sumoylation</u>	24
<u>I-6 Régulation du processus de sumoylation</u>	25
<u>I-6-1 Par les stress cellulaires</u>	26
<u>I-6-2) Par les protéines virales</u>	28
<u>I-7)Inter-relations entre la sumoylation et les autres modifications post-traductionnelles</u>	29
<u>I-7-1) La sumoylation et l'ubiquitination</u>	29
<u>I-7-2 )La sumoylation et l'acétylation</u>	32
<u>I-7-3)La sumoylation et la méthylation</u>	33
<u>I-7-4)La sumoylation et la phosphorylation</u>	33
<u>II-Conséquences fonctionnelles de la sumoylation des récepteurs nucléaires ER et RXR</u>	36
<u>II-1 La grande famille des récepteurs nucléaires</u>	36
<u>II-1-1) Structure</u>	36
<u>II-1-2) Mécanismes d'action</u>	37
<u>II-1-3) Régulation de l'activité des récepteurs nucléaires</u>	37
<u>II-2) Sumoylation de ER et RXR : impact fonctionnel</u>	38
<u>II-2-1) Généralités sur la sumoylation des récepteurs nucléaires et leurs cofacteurs</u>	38
<u>II-2-2) Sumoylation de ER</u>	39
<u>II-2-3) Les récepteurs aux rétinoïdes</u>	42
Bibliographie	45

## **Abréviations :**

**AR:** Acide Rétinoïque  
**ARN :** Acide RiboNucléique  
**ARNm :** Acide RiboNucléique messenger  
**ATP :** Adénosine-Tri-Phosphate  
**BSA:** sérum d'albumine bovine  
**CAPS :** Acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique  
**CELO :** chicken embryo lethal orphan  
**CK2 :** Caséine Kinase 2  
**CMV:** CytoMégaloVirus  
**DBD:** DNA Binding Domain  
**DMEM :**Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DR:** Direct Repeat  
**DRP1:** Dynamin Related Protein 1  
**ER:** Estrogen Receptor  
**ERE:** Estrogen Responsive Element  
**ERK5 :**Extracellular-signal-Regulated Kinase 5  
**E<sub>2</sub>:** estradiol  
**FAK:** Focal Adhesion Kinase  
**GRIP-1:** Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein-1  
**GSK3b:** Glycogen Synthase Kinase 3b  
**HAT:** Histone AcétylTransférase  
**HDAC:** Histone Deacetylase  
**HIC1:** Hypermethylated In Cancer 1  
**HIF1:** Hypoxia Inducible Factor 1  
**HIPK2:** Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2  
**HSF :** Heat Shock Factor  
**HSP:** Heat Shock Protein  
**HSV:** Herpes Simplex Virus  
**LBD :** Ligand Binding Domain  
**IKK:** IB Kinase  
**IL6:** InterLeukin6  
**LBD:** Ligand Binding Domain  
**MEF:** mouse embryonic fibroblast  
**MEF2:** Myocyte Enhancer Factor 2  
**MUL1:** mitochondrial E3 ubiquitin  
**NDSM:** Negatively charged amino acid-Dependent Sumoylation Motif  
**NEM:** N-EthylMaléimide  
**NEMO:** NF-B Essential Modulator  
**NES:** Nuclear Export Signal  
**NF-B:** Essential Modulator  
**NLS:** Nuclear Localization Signal  
**NO:** Nitric Oxyde  
**NPC:** Nuclear Pore Complex  
**NPM1:** NucléoPhosMine 1  
**PAGE:** PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**PARP-1:** Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1  
**PBS:** Phosphate Buffer Salin  
**PDSM:** Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif  
**PML:** ProMyelocytic Leukemia  
**PIAS:** Protein Inhibitor of Activated STAT  
**PRMT1 :** protein arginine N-methyltransferase

**PTP1B:** Protein Tyrosine Phosphatase **1B**  
**PVDF:** PolyVinylidene Fluoride  
**RanBP2:** Ran GTP Binding Protein **2**  
**Ran GAP1:** Ran GTPase Activating Protein **1**  
**RAR:** Retinoic Acid **R**eceptor  
**Rhes:** Ras **H**omologue **E**nriched in the **S**triatum  
**ROS:** Radical **O**xygen **S**pecies  
**RSUME:** **R**WD-containing **s**umoylation **e**nhancer  
**RXR :** Retinoid **X** **F**actor  
**SAE1:** SUMO-Activating enzyme **E1**  
**SBM:** SUMO-**B**inding **D**omain  
**SDS:** Sodium **D**odecyl **S**ulfate  
**SENP:** **S**entrin-specific-**p**rotease  
**SIM:** SUMO-**I**nteracting **M**otifs  
**SRC-1:** Steroid **R**eceptor **C**oactivator-1  
**STUBLs:** SUMO-targeted **u**biquitin **L**igases  
**SUMO:** Small Ubiquitin-related **M**odifier  
**SVF:** Serum veau foetal  
**TLS:** Translocated in **L**iposarcoma  
**TNF:** Tumor **N**ecrosis **F**actor  
**TOPORS:** Topoisomerase I-binding  
**TRAF7:** Tumor-necrosis-factor-associated protein **7**  
**UBC9:** Ubiquitin-conjugating enzyme **9**

# Introduction

## PREFACE

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme dans les pays occidentaux. Avec près de 42 000 nouveaux cas par an et environ 11 000 décès annuels, il représente un problème majeur de santé publique en France, comme dans le reste du monde (il s'agit de la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires et c'est le cancer le plus fréquent chez la femme). Chez 75% des femmes qui développent un cancer du sein, aucun facteur de risque ne peut être déterminé. Bien que les nouvelles approches thérapeutiques se soient montrées bénéfiques pour un grand nombre de patientes, environ 30% de ces patientes présentent une résistance *de novo* ou acquise aux traitements. Il est donc extrêmement important de bien comprendre le cancer du sein afin d'avoir toutes les armes pour le combattre, car bien que des progrès substantiels aient été enregistrés ces dernières années, un nombre significatif de patientes évolue encore vers la rechute métastatique, qui demeure incurable à l'heure actuelle. Il existe donc un réel besoin de développer des nouveaux marqueurs afin de permettre une thérapie ciblée.

De nombreux arguments épidémiologiques (environ 95% des cancers du sein sont hormonodépendants) et cliniques démontrent clairement une implication des oestrogènes (en dehors de leurs fonctions physiologiques) à la fois dans la prolifération et le potentiel métastatique des cellules mammaires (Pasqualini, 2004). La diversité et la spécificité des effets des estrogènes sur les différents tissus impliquent une régulation très fine de l'activité de leur récepteur ER $\alpha$ . ER $\alpha$  est exprimé dans environ 70% des cancers du sein (Khan et al, 1998), alors qu'il n'est exprimé qu'à un taux d'environ 15 à 25% dans les cellules épithéliales normales. Toutefois, la présence de ER est un facteur de bon pronostic en terme de survie car des thérapies endocriniennes peuvent être mises en place alors que les tumeurs ER (-) ont un phénotype beaucoup plus agressif. En effet, non seulement des anti-estrogènes tels que le tamoxifène (qui empêche l'interaction des estrogènes avec ER) et le fulvestrant (qui induit la dégradation de ER) mais également des anti-aromatases (qui vont diminuer la production d'estrogènes dans les tissus périphériques et dans la tumeur) sont utilisés dans la thérapie de la plupart des cancers du sein. D'autres molécules telles que les rétinoïdes sont également capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des tumeurs mammaires, et dans certains cas, ils agissent en synergie avec le tamoxifène (Altucci *et al.* 2001, 2007 ; Brtko J, 2007).

Les estrogènes et les rétinoïdes agissent par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires spécifiques : ER(,) et RAR/RXR (,,). Comme nous le verrons plus en détail dans l'introduction, ce sont des facteurs de transcription qui, en réponse au ligand, se fixent au niveau d'éléments de réponse localisés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles et recrutent des complexes protéiques appelés corégulateurs afin de réguler leur expression. Toutes ces fonctionnalités sont déterminées via les nombreuses modifications post-traductionnelles que vont subir non seulement les récepteurs mais également ses partenaires protéiques.

A ce jour, les modifications post-traductionnelles sont considérées comme des « codes barres moléculaires » dynamiques qui doivent être décryptés et qui traduisent des informations moléculaires. Elles confèrent aux protéines la capacité d'agir rapidement au bon moment et au bon endroit. C'est donc un moyen de réguler la physiologie cellulaire et de contrôler de manière très spécifique et très fine la demi-vie, la localisation et l'activité des protéines. Le fait qu'une protéine subisse non seulement diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, méthylation, sumoylation, ubiquitination...) mais également dans diverses combinaisons contribue fortement à amplifier la

fonctionnalité et la diversité de ce facteur. Etudier les interactions entre les différentes voies de modifications post-traductionnelles est essentiel pour bien comprendre la mise en place de ces modifications (seules et en coordination). Cela nous permettrait également de comprendre leur impact afin de prédire les conséquences néfastes de leur dérégulation au cours de la progression tumorale et/ou dans certains cas de la résistance à l'hormonothérapie. La potentialité de cibler une modification post-traductionnelle dans le traitement des cancers du sein est une alternative attractive par rapport à la thérapie endocrinienne classique. De plus, cela permettrait de démontrer comment des découvertes basiques dans la biologie des récepteurs nucléaires peuvent avoir un impact majeur dans la prévention et le traitement des cancers du sein. De ce fait, la modulation sélective de la voie de signalisation des récepteurs nucléaires en combinaison avec des régulateurs des voies de modifications post-traductionnelles (en amont ou en aval des traitements classiques) devrait conduire à un traitement plus efficace. L'équipe du Dr Corbo dans laquelle j'ai effectué mon stage EPHE travaille sur l'une de ces modifications post-traductionnelles qui touche aussi bien ER que RXR: la sumoylation.

Dans la première partie de ce mémoire, je me concentrerai donc sur cette modification post-traductionnelle. Dans un premier temps je traiterai du processus de sumoylation en décrivant non seulement son déroulement mécanistique, mais également quelles sont les conséquences fonctionnelles de cette modification (sans être exhaustive mais en prenant des exemples clefs de la littérature) et ses principaux régulateurs. Je terminerai cette partie en décrivant quelles sont les principales inter-relations entre la sumoylation et les autres modifications post-traductionnelles. Puis, je me focaliserai sur les données de la littérature concernant la sumoylation des deux récepteurs nucléaires auxquels je me suis intéressée tout au long de mon stage EPHE : ER $\alpha$  et RXR $\alpha$ .

La deuxième partie de ce mémoire décrit les travaux réalisés et les résultats obtenus. Ces travaux concernent d'une part l'implication du processus de sumoylation/désomoylation dans la régulation de l'activité de ER $\alpha$  et d'autre part sur l'inter-relation entre la phosphorylation et la sumoylation de RXR $\alpha$ .

Pour finir, je présenterai des perspectives découlant de nos résultats et de ceux publiés par d'autres laboratoires concernant cette thématique de recherche.

## Introduction

### I. La Sumoylation

La Sumoylation est une modification post-traductionnelle des protéines, dynamique et réversible. Elle conduit à la liaison covalente d'une ou plusieurs petite(s) protéine(s) **SUMO** (**S**mall **U**biquitin-related **M**odifier) sur les résidus lysines des protéines cibles (Gareau et Lima, 2010). La découverte tardive de SUMO (1996) et la difficulté à étudier cette modification post-traductionnelle sont en grande partie dues au fait que ce processus est hautement dynamique et que seulement une petite partie du protéome (estimée à moins de 1%) est sumoylé *in vivo* (Johnson ES *et al.* 2004). De plus à ce jour aucun anticorps ciblant spécifiquement une protéine sumoylée n'a pu être mis au point; ce serait pourtant un outil indispensable pour nos études. Ceci limite donc considérablement notre champ d'investigation en terme d'étude de la dynamique de ce processus. De nombreuses

protéines, tant nucléaires que cytoplasmiques et membranaires, sont sumoylées (Cheng *et al.* 2006). De ce fait, le processus de sumoylation joue un rôle clef dans la régulation de divers processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, l'intégrité du génome, la transcription des gènes, la différenciation et la localisation cellulaire.

### I-1 La famille SUMO

Lors de sa découverte, SUMO a été identifié comme étant un proche parent de l'ubiquitine, ce qui explique son nom. En effet, bien que les séquences de l'ubiquitine et de SUMO ne présentent que 18% d'identité, elles ont toutes deux une structure tridimensionnelle très similaire : elles sont formées d'un domaine globulaire entouré par des feuillettes  $\beta$  autour d'une hélice  $\alpha$  (Bayer P *et al.* 1998). De plus ces deux protéines sont toutes deux présentes au départ sous la forme d'un précurseur inactif qui est mûri en une forme active par des protéases spécifiques.

Sumo constitue une famille de protéines très bien conservée chez tous les eucaryotes qui sont nécessaires au fonctionnement normal des cellules. Les Eucaryotes inférieurs, comme le nématode et la levure, ont 1 seul gène SUMO. Par contre, quatre isoformes de SUMO ont été identifiées chez les mammifères : SUMO-1 (aussi appelé sentrine, GMP-1, PIC1, UBL1 ou encore Smt3c), SUMO-2 (nommé également sentrin-3 ou Smt3a), SUMO-3 (appelé sentrin 2, Smt3b) et enfin SUMO-4 (Johnson, 2004 ; Mukhopadhyay et Dasso, 2007). Ces différentes isoformes sont présentes dans tous les tissus à l'exception de SUMO-4 dont l'expression est limitée à certains tissus tels que le rein et la rate.

SUMO-4, qui est la dernière isoforme de SUMO mise en évidence, serait une forme précurseur inactive car elle est insensible aux SUMOprotéases (également appelées SENP, **S**entrin-**s**pecific-**p**rotease). Elle serait donc incapable de devenir mature et de se conjuguer sur des substrats protéiques (Owerbach *et al.* 2005).

En fait, cette isoforme n'a été détectée qu'au niveau ARN (**A**cide **R**ibo**N**ucléique) (et jamais au niveau protéique) par homologie de séquence. Ce serait un pseudogène car il ne possède pas d'intron. De plus ses ARNm (**A**cide **R**ibo**N**ucléique **m**essenger) n'ont été détectés que dans un nombre limité de tissus, principalement dans la rate, le rein et la lymph. (Guo *et al.* 2004 ; Bohren Kurt *et al.* 2004).

SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3 ont la même structure tridimensionnelle : elles sont constituées d'un domaine globulaire entouré de feuillettes autour d'une hélice  $\alpha$  (Bayer *et al.* 1998). Cependant, leurs séquences peptidiques sont différentes. La séquence de la forme mature de SUMO-1 est identique à environ 50% à SUMO-2 et SUMO-3. SUMO-2 et 3 quant à eux, partagent 97% d'homologie et sont souvent désignés ensemble dans la littérature sous la forme SUMO-2/3, ce qui sera également le cas dans ce rapport.

Dans la cellule ces différentes isoformes apparaissent comme ayant les mêmes propriétés mais elles sont cependant fonctionnellement différentes.

En effet, tout d'abord elles sont présentes de différentes manières dans les cellules : il y a beaucoup plus de protéine SUMO 2/3 libre par rapport au taux de protéine SUMO-1 libre, cette dernière se trouvant essentiellement sous forme conjuguée sur ses substrats (Hecker *et al.*, 2006). En fait, les protéines SUMO 2/3 sont considérées comme un

réservoir pour la sumoylation lors de stress cellulaires et de choc thermique (Johnson, 2004 ; Mulhophadhy et Dasso, 2007; Brunet *et al.* 2009) alors que la protéine SUMO-1 est en majorité conjuguée à des protéines et sa conjugaison ne semble pas liée à des conditions physiologiques spécifiques.

D'autre part, ces isoformes se fixent avec plus ou moins d'affinité à certaines protéines. Par exemple RanGAP1 (**R**an **G**T Pase **A**ctivating **P**rotein **1**) (la première protéine identifiée comme étant sumoylée) est préférentiellement modifiée par SUMO-1 *in vivo*, alors qu'*in vitro* les 3 isoformes peuvent être conjuguées à ce substrat (Johnson E.S., 2004). Tandis que la topoisomérase II est essentiellement modifiée par SUMO 2/3 durant la mitose (Azuma *et al.* 2003).

Il est intéressant de noter que récemment une équipe a montré que la substitution entre les différents membres de la famille de SUMO serait possible (Evdokimov *et al.* 2008). En effet, l'étude de souris déficientes pour SUMO-1 a révélé que SUMO-2 et/ou SUMO-3 viendraient compenser SUMO-1 lorsque ce dernier serait absent en venant se conjuguer sur les protéines cibles de SUMO-1 (Zhang *et al.* 2008).

## I-2 Conjugaison de SUMO sur les protéines cibles

### I-2-1 Principales étapes du processus de sumoylation

D'un point de vue mécanistique, le processus de sumoylation est comparable à celui de l'ubiquitination: il s'agit d'un processus dynamique et réversible régulé par différentes enzymes (qui sont bien sûr différentes dans les deux systèmes). Dans un premier temps, une étape de maturation permet d'activer un précurseur inactif, puis 3 étapes de conjugaison successives vont conduire à la formation d'une liaison covalente entre la protéine mature (SUMO ou ubiquitine) et le résidu lysine des protéines cibles.

#### I-2-1-A) Maturation du précurseur inactif

Toutes les protéines SUMO sont tout d'abord synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif, appelé Pro-SUMO, qui est ensuite mûri par l'activité hydrolase d'enzymes spécifiques appelées SENPs (**S**entrin-specific-**p**rotease) qui agissent lors de la maturation en tant qu'endopeptidase (car nous verrons au chapitre I-3 que ces mêmes enzymes sont impliquées dans la désomoylation des protéines, et que là elles agissent en tant qu'isopeptidase). Ces enzymes permettent l'exposition d'un doublet de glycine (GG) au niveau de la partie C-terminale de la protéine SUMO. Cette forme mature est absolument indispensable pour permettre la conjugaison de SUMO sur son substrat puisque c'est cette glycine en position C terminale qui formera un lien isopeptidique avec la chaîne latérale de la lysine de la protéine cible.

#### I-2-1-B) Etape d'activation

La protéine SUMO une fois mûrie est activée selon un processus ATP (**A**dénosine-**T**ri-**P**hosphate) dépendant par l'enzyme E1 formée d'un hétérodimère de protéines appelé SAE1/SAE2 (**S**UMO-**A**ctivating enzyme **E1**) chez les mammifères et AOS1/UBA2 chez la levure (Johnson, 1997 ; Desterro, 1999). Cette étape est appelée étape d'activation. Bien

que ce soit SAE2 qui porte le site actif contenant la Cystéine nécessaire à la formation de la liaison thio-ester avec SUMO, les deux sous unités de cet hétérodimère sont indispensables à l'activation de la protéine SUMO. Il est acquis que ces deux monomères sont incapables de fonctionner indépendamment l'un de l'autre. Cette liaison covalente entre SUMO et SAE2 utilise de l'énergie sous forme d'ATP pour adényler la glycine de l'extrémité C-terminale de SUMO.

#### I-2-1-C) Etape de conjugaison

SUMO une fois activée est ensuite transférée sur l'enzyme E2 UBC9 (**ubiquitin-conjugating enzyme 9**) qui est l'enzyme de conjugaison, via la formation d'une liaison thioester entre le résidu Cys93 d'UBC9 et la glycine située en C terminal de SUMO. UBC9 est la seule enzyme de conjugaison connue pour SUMO contrairement au processus d'ubiquitination pour lequel environ une dizaine de E2 ont été décrites.

UBC9 a été montrée comme étant elle-même un substrat de la sumoylation. Cette sumoylation se fait majoritairement sur la lysine 14 d'UBC9 (Knipscheer *et al.* 2008). La sumoylation d'UBC9 n'affecte pas la liaison UBC9-SUMO-1 mais altère la capacité d'UBC9 à modifier certains substrats de la sumoylation. Par exemple, la sumoylation de RanGAP1 par UBC9 sumoylé est dramatiquement réduite tandis que la sumoylation de l'antigène nucléaire Sp100 est améliorée par UBC9 sumoylé (Wilkinson et Henley, 2010).

#### I-2-1-D) Etape de ligation sur le substrat

*In vitro*, cette enzyme UBC9 serait suffisante pour reconnaître SUMO et le site de sumoylation du substrat ainsi que pour former la liaison avec le groupement  $\epsilon$ -aminé de la Lysine du site de sumoylation. Cette interaction a été montrée par double hybride dans la levure avec toutes les isoformes de SUMO (Johnson, 1997). UBC9 ne fonctionne pas avec l'ubiquitine, elle est vraiment spécifique de SUMO. En effet, UBC9 est chargée positivement à sa surface ce qui est compatible avec la surface chargée négativement de SUMO mais pas avec celle de l'ubiquitine (Giraud, 1998). D'ailleurs, UBC9 présente une réelle divergence de séquence avec l'enzyme E2 de l'ubiquitine.

Cependant, *in vivo*, pour finaliser la liaison de SUMO à son substrat il faut qu'une E3 ligase intervienne. Les mécanismes d'action de ces enzymes peuvent être multiples: (1) l'enzyme agirait en augmentant l'affinité d'UBC9 pour son substrat et en stabilisant ainsi l'interaction UBC9/substrat; (2) elle pourrait également aider à la bonne orientation du résidu lysine du substrat ou encore (3) contribuer mécaniquement à la conjugaison. À ce titre, les SUMO-E3 ligases sembleraient particulièrement déterminer une certaine spécificité de substrat *in vivo*.

Chez la levure, 2 SUMO-E3 ligases ont été identifiées : SIZ1 et SIZ2 (Johnson, 2004). Par contre chez les mammifères, 3 grandes familles de SUMO-E3 ligases ont été décrites: les protéines de la famille PIAS (**P**rotein **I**nhibitor of **A**ctivated **S**TAT) (Kahyo *et al.* 2001), la protéine des pores nucléaires RanBP2 (**R**an **G**T**P** **B**inding **P**rotein **2**) (Pichler *et al.* 2002), et la protéine du groupe polycomb Pc2 (Kagey *et al.* 2003).

Les SUMO-E3 ligases de la famille PIAS sont constituées chez les Eucaryotes de PIAS1, PIAS3, PIASx, PIASxet PIASy. (Kahyo, 2001 ; Schmidt, 2002 ; Nishida et Yasuda, 2002 ; Sapetschning *et al.* 2002). Elles contiennent toutes un domaine SP-RING

(similaire au domaine RING retrouvé chez les ubiquitines E3-ligases) qui interagit avec UBC9 et le substrat et qui va donc stimuler la sumoylation vers la protéine cible (Johnson, 2004). Ce domaine fonctionnel est nécessaire à leur activité E3 SUMO ligase. Ces protéines de la famille PIAS n'ont pas les mêmes substrats de sumoylation, même si occasionnellement certaines cibles communes ont été décrites (Schmidt et Muller, 2002).

D'autres protéines ayant un domaine SP-RING ont récemment été décrites comme ayant potentiellement une activité SUMO-E3 ligases: TOPORS (Topoisomerase I-binding) qui sumoyle p53 (Weger *et al.* 2005), MUL1 (mitochondrial E3 ubiquitin, aussi appelé MAPL) (Wilkinson et Henley, 2010 ; Braschi *et al.* 2009) qui sumoyle DRP1 (Dynamin-Related Protein 1) et MMS21 qui favorise la sumoylation de SMC5/6 qui participe à l'intégrité du génome. (Hay, 2005). TOPORS a la particularité d'être à la fois une SUMO-E3 ligase et une ubiquitine E3 ligase (Rajendra *et al.* 2004 ; Weger *et al.* 2005) suggérant que cette protéine pourrait jouer un rôle clef dans la régulation des interactions entre les processus de sumoylation et d'ubiquitination (voir chapitre I-7-1).

Pc2, qui appartient à la famille des protéines polycomb qui sont des complexes protéiques multimériques impliqués dans l'inactivation de l'expression des gènes, est la SUMO-E3 ligase du corepresseur transcriptionnel CtBP (Kagey *et al.* 2003). Pc2 ne contient pas de domaine RING et n'a aucune similitude avec une ubiquitine ligase connue. Cependant, elle interagit directement avec UBC9, SUMO-1 et son substrat, suggérant qu'elle peut elle aussi fonctionner comme une protéine intermédiaire facilitant le transfert de SUMO d'UBC9 sur la protéine cible (Kagey MH *et al.* 2003). D'autres SUMO-E3 ligases n'ayant pas de domaine RING et semblant fonctionner comme Pc2 ont également été identifiées telles que HDAC4 (Histone Deacetylase 4) (Gregoire. et Yang, 2005 ; Lee *et al.* 2009) qui sumoyle MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), HDAC7 (Histone Deacetylase 7) qui sumoyle PML (ProMyelocytic Leukemia) (Gao *et al.* 2008), la protéine G Rhes qui sumoyle RanGAP1, Sp100 (Subramaniam *et al.* 2009), la protéine qui se lie à l'ARN TLS (Translocated in Liposarcoma) (Oh *et al.* 2010) et TRAF7 (Tumor-necrosis-factor-associated protein 7) qui sumoyle c-Myb (Morita *et al.* 2005).

RanBP2, quant à elle, est une protéine des pores nucléaires qui ne présente pas d'homologie structurale avec une E3-ligase de l'ubiquitine. Elle peut se lier directement à UBC9 et SUMO-1 et ainsi promeut la fixation de SUMO sur son substrat. Contrairement aux autres SUMO-E3 ligases actuellement décrites, RanBP2 n'interagit pas directement avec le substrat. A ce jour, un seul substrat a été décrit *in vivo* pour cette SUMO-E3 ligase : il s'agit de RanGAP1. RanBP2 joue un rôle clef dans la localisation cellulaire des protéines (Zhu *et al.* 2009 ; Pichler *et al.* 2002). Cependant, *in vitro*, d'autres substrats de RanBP2 ont été décrits, tels que Sp100, HDAC4 (Kirsh *et al.* 2002) ou encore PML (Saitoh *et al.* 2006). Cependant jusqu'à présent ces substrats n'ont pas été confirmés *in vivo*.

Parmi ces différentes SUMO-E3 ligases identifiées, certaines présentent des spécificités de substrat, et d'autres vont préférentiellement conjuguer certaines isoformes de SUMO sur un substrat donné.

### I-2-2: Site consensus de sumoylation

Comme nous venons de le voir, tout comme pour l'ubiquitination, c'est une lysine qui est toujours visée lors de la sumoylation d'une protéine cible. L'identification de nombreuses cibles de la sumoylation et la caractérisation des lysines sumoylées a permis de définir une séquence consensus de sumoylation:  $\_KXE$  où  $\_$  est un acide aminé hydrophobe (souvent valine, leucine, ou isoleucine) et X un résidu quelconque (Johnson, Erica S, 2004). C'est avec cette séquence consensus que l'enzyme E2 UBC9 va directement interagir lors de sa reconnaissance du substrat. Un tel site consensus n'a jamais pu être mis en évidence dans le système ubiquitine. Cette séquence est suffisante pour induire une sumoylation *in vitro* et pendant longtemps on a pensé qu'un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal) devait lui être ajouté pour que la sumoylation soit possible *in vivo* (Rodriguez *et al.* 2001). Ceci est vrai pour la majorité des cibles connues à l'heure actuelle, toutefois, le fait que de nouvelles protéines non nucléaires soient sumoylées telles que par exemple, la protéine mitochondriale DRP1, ou des protéines cytoplasmiques (GLUT1, GLUT4) ou membranaire (mGluR8, GluR6) (Gleiss-Friedlander et Melchior, 2007), ne permet pas de généraliser la nécessité absolue d'un NLS pour être sumoylé (Harder *et al.* 2004).

Bien qu'environ 70% des protéines sumoylées le soient sur un site consensus de sumoylation, il est bon de noter que SUMO peut être conjugué sur des lysines qui ne figurent pas dans un site consensus et que tous les sites  $\_KXE$  ne sont pas sumoylés *in vivo* (Sampson *et al.*, 2001 ; Ulrich, 2009). Cependant, le mécanisme exact selon lequel la protéine est sumoylée sur un site non consensus reste à être clarifié. Bien qu'il ait été émis l'hypothèse d'une intervention des SUMO-E3 ligases qui viendraient faire le lien entre UBC9 et le substrat. Toutefois, à l'heure actuelle, le site  $\_KXE$  reste le seul motif consensus connu de sumoylation.

### I-2-3 Etat de sumoylation des protéines

Les protéines peuvent être sumoylées sur une ou plusieurs lysines mais également polysumoylées (Figure 6). En effet SUMO-2 et 3 peuvent former des chaînes de poly-SUMO *in vitro* et *in vivo* (Mulhopadhyay et Dasso, 2007) contrairement à SUMO-1. Ceci est dû à la présence d'un site consensus de sumoylation sur la K11 de SUMO-2/3, résidu qui est absent sur SUMO-1.

Sur un même substrat, plusieurs résidus lysines peuvent être sumoylés en même temps. Ils peuvent être conjugués à SUMO-1 et les autres par SUMO 2/3. De plus dans les chaînes de polysumoylation, SUMO-1 peut être également présent en bout de chaîne.

## I-3 Clivage entre SUMO et son substrat: la désomoylation

Le processus de sumoylation est un processus dynamique et réversible (désomoylation) au cours duquel la conjugaison et le clivage de la protéine SUMO sur son substrat sont des événements qui ont lieu en continu et de manière très rapide. Le processus de désomoylation permet de contrôler la demi-vie des protéines sumoylées, et donc de réguler de manière extrêmement fine les voies fonctionnelles dans lesquelles ces dernières sont impliquées. De plus, cela permet de générer un nouveau pool de protéine SUMO libre qui devient disponible pour être conjugué sur de nouveaux substrats. Cette déconjugaison de SUMO est donc importante et indispensable pour le bon fonctionnement de la cellule.

En effet, dans des conditions physiologiques normales, seule une petite fraction des protéines totales exprimées dans la cellule est conjuguée à SUMO. Il est donc évident que l'activité isopeptidase des désomoylases, que l'on nommera SENPs, est essentielle pour maintenir un niveau stable de protéine sumoylée. De plus, de nombreuses données indiquent clairement que la proportion de protéines sumoylées par rapport à celle de protéines non sumoylées, en d'autres termes la balance entre sumoylation/désomoylation, est essentielle pour la vie de la cellule (Xhu *et al.* 2009). La perte de cette balance a été clairement associée à de nombreuses maladies dont des cancers (Bawa-Khalfe et Yeh, 2010). En effet, il a été rapporté que les composants de la machinerie de sumoylation sont soit surexprimés soit inhibés dans certains types de cancer. Par exemple dans le cancer de la prostate il a été observé une augmentation de l'expression des désomoylases SENP1 et SENP3 (Bawa-Khalfe et Yeh, 2010). SENP3 a été également rapporté comme surexprimé dans le cancer des ovaires, du poumon et du colon (Bawa-Khalfe et Yeh, 2010). Alors que dans le cancer du sein il a été démontré une augmentation de l'expression de UBC9 et de PIAS3 ainsi qu'une diminution d'expression de SENP6 (Mooney *et al.* 2010 ; Wang et Banerjee, 2004 ; Mo *et al.* 2005).

### I-3-1 Mécanisme de désomoylation

La désomoylation implique le clivage de la liaison amide entre le groupe carbonyle de la glycine en C terminal de SUMO et le groupement  $\epsilon$ -aminé de la Lysine du site de sumoylation. Cette étape cruciale est catalysée par l'action des mêmes enzymes qui sont requises pour la maturation de SUMO: les SENPs, appelées Ulp (ubiquitin-like protein) chez la levure, que j'appellerai également dans ce mémoire les désomoylases. En effet, outre leur activité endopeptidase (maturation de Pro-SUMO), ces enzymes ont également une activité isopeptidase qui assure la réversibilité du processus de sumoylation.

Le processus de dépolymérisation (clivage des chaînes de polysumoylation) est mécaniquement équivalent à celui de la déconjugaison. Sauf qu'au lieu d'avoir un clivage de la liaison amide entre le groupe carbonyle de la glycine en C terminal de SUMO et le groupement  $\epsilon$ -aminé de la Lysine de la protéine sumoylée, c'est le groupement  $\epsilon$ -aminé de la Lysine cible de SUMO 2/3 qui est impliqué.

### I-3-2 Les désomoylases :

Alors qu'il n'y a que 2 protéases spécifiques de SUMO chez la levure, Ulp1 et Ulp2, on en dénombre 6 chez l'homme qui sont codées par 6 gènes différents: SENP1 (SuPr-2), SENP2 (Axam, SMT3IP2/Axam2, SuPr1), SENP3 (SSP3, SMT3IP1), SENP5, SENP6

(Susp1 ou SSP1) et SENP7 (Mukhopadhyay et Dasso, 2007). Les protéines de levure ne seront pas développées dans ce chapitre mais vous pouvez avoir des détails les concernant en consultant les revues indiquées (Li et Hochstrasser, 1999 ; Hay, 2007 ; Yeh, 2009). En effet, nous nous concentrerons sur les protéines de mammifère étant donné que les travaux contenus dans ce rapport ne portent que sur celles-ci.

Toutes ces SENPs appartiennent à la famille des Cystéines protéases qui partagent un domaine catalytique du côté carboxy-terminal très bien conservé (bien qu'il soit variable en longueur) contenant environ 250 acides aminés (Xu *et al.* 2009). Le site actif de ce domaine est constitué de la triade catalytique Histidine, Aspartate, cystéine ainsi que d'une glutamine très conservée (Li *et al.* 1999). Ces enzymes ont en revanche, un domaine N terminal très différent. Ce domaine N terminal régule à la fois la localisation cellulaire et la spécificité de substrat.

Ces SENPs se distinguent les une des autres comme nous allons le voir de par leur distribution cellulaire, leur spécificité à maturer ou non certaines des isoformes de SUMO ainsi que leur spécificité à déconjuguer SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 et/ou les chaînes de polysumoylation appelé activité « chain editing » et que je nommerai activité de dépolysumoylation.

Actuellement, ces désomoylases ont été classées en 3 grandes sous familles que nous allons détailler.

### **I-3-2-A Première famille: SENP1 et SENP2**

La première famille est constituée de SENP1 et SENP2 qui présentent la même affinité pour les différentes isoformes de SUMO, aussi bien en terme de maturation de la pro-protéine qu'en terme de clivage de la liaison covalente entre SUMO et son substrat (Yeh, 2009). Ces 2 protéines partagent 59% d'homologie entre elles au niveau de leur domaine catalytique (Xu *et al.* 2009).

SENP1 est localisée principalement dans le noyau mais elle est toutefois exclue du nucléole. Cette protéine contient un signal NLS non consensus situé au sein de son domaine N-Terminal entre les acides aminés 171 et 177 (Xu *et al.* 2009 ; Bailly *et al.* 2004). SENP1 contient également un signal d'export nucléaire (NES: Nuclear Export Signal) dans la région C-terminale, ce qui lui permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Kim *et al.* 2005). Le trafic intracellulaire de SENP1 est régulé par le facteur TNF (Tumor Necrosis Factor) et les ROS (Radical Oxygen Species) (Xu *et al.* 2009).

Bien que SENP1 participe à la maturation de toutes les isoformes de SUMO, elle a cependant une préférence pour SUMO1 (Xu et Au, 2005). En effet, les cellules déficientes pour SENP1 (par une insertion rétrovirale dans le promoteur de SENP1) accumulent des formes de SUMO-1 non maturées (Pro-SUMO1), ce qui indique que SENP1 est la principale hydrolase de la région C-terminale de pro-SUMO1 (Yamaguchi *et al.* 2005). De plus, ces cellules présentent un taux beaucoup plus élevé de protéines conjuguées à SUMO-1 alors que le taux de SUMO 2/3 libre et mûr ainsi que le taux de protéines conjuguées à SUMO-2/3 reste inchangé. SENP1 mature toutes les isoformes de SUMO en présentant toutefois une efficacité de maturation différente selon l'isoforme considérée; son ordre de préférence allant de manière décroissante de SUMO-1 à SUMO-2 puis SUMO-3 (Xu *et al.* 2009).

Actuellement, de nombreuses protéines sumoylées cibles de SENP1 ont été décrites, elles appartiennent majoritairement à la grande famille des facteurs de transcription et leurs co-régulateurs (Bawa-Khalfe *et al.* 2007 ; Cheng *et al.* 2004).

Comme le démontre les études réalisées sur des souris transgéniques, le rôle biologique de SENP1 est fortement associé au développement. En effet, les souris transgéniques ayant une réduction de l'expression de SENP1 montrent des anomalies placentaires et les embryons ne sont pas viables dû à des anomalies du placenta (Gong *et al.* 2000). De plus, il a également été rapporté que SENP1 module la stabilité de HIF1- au cours de l'hypoxie et contrôle la production de l'érythropoïétine lors de la différenciation des globules rouges (Liu et Shuai, 2008). D'autre part, la surexpression de SENP1 entraîne également des anomalies puisque lorsqu'elle est surexprimée dans des œufs de xénope, une inhibition du développement embryonnaire dorso-antérieur ainsi qu'une inhibition de la voie de signalisation Wnt a été décrite (Mukhopadhyay et Dasso, 2007). L'implication clinique de SENP1 dans le développement des cancers de la prostate vient d'être récemment décrite (Bawa-Khalfe *et al.* 2007). En effet, SENP1 est surexprimé dans 60% des cas de lésions cancéreuses précoces de la prostate et dans les tissus cancéreux de la prostate, alors qu'aucune surexpression de SENP1 n'est observée dans le tissu sain de la prostate. En fait, il a clairement été démontré que SENP1 stimule l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes, dérégulant ainsi l'expression de gènes impliqués entre autre dans la croissance cellulaire et l'apoptose (Bawa-Khalfe *et al.* 2007 ; Cheng *et al.* 2006). Cette dérégulation est médiée via la désomoylation de HDAC1 (une histone déacétyl transférase, co-régulateur de l'activité transcriptionnelle de AR) par SENP1, conduisant ainsi à une diminution de son activité déacétylase et donc à une augmentation du taux de transcription des gènes cibles de AR (Yeh, 2009). De plus, SENP1 est une cible transcriptionnelle du récepteur aux androgènes (il l'active) (Bawa-Khalfe *et al.* 2007). Son expression est également induite par l'IL6 (InterLeukin6) (Cheng *et al.* 2006).

Il est intéressant de noter que SENP1 est conjuguée à SUMO-1 sur une lysine située dans son site catalytique, suggérant une autorégulation potentielle de SUMO-1 modifiant donc son activité protéasique (Bailey et O'Hare, 2004).

SENP2, le deuxième membre de cette sous-famille, est localisée dans les corps nucléaires PML (Cheng *et al.* 2006) et est associée à la membrane nucléaire via son interaction avec la nucléoporine Nup153 (Hang et Dasso, 2002 ; Zhang *et al.* 2002). SENP2 contient un NLS bi-partite classique localisé dans la partie N-terminale (dans les 63 premiers acides aminés) (Zhang *et al.* 2002 ; Itahana *et al.* 2006), et un NES localisé dans la partie centrale entre les résidus 317 à 332 (Itahana *et al.* 2006). SENP2 est capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (expériences d'hétérocaryon), et lorsqu'elle est exportée dans le cytoplasme, elle est polyubiquitinée et dégradée par le protéasome 26S (Itahana *et al.* 2006). SENP2 présente des activités enzymatiques similaires à celles de SENP1 lorsqu'elle est surexprimée: elle a la même activité isopeptidase vis-à-vis des différentes isoformes de SUMO. Cependant, il a été montré que SENP2 intervient principalement dans la maturation de SUMO-2 (Reverter et Lima, 2006).

Suite à des évènements d'épissage alternatif, trois isoformes de SENP2 sont générés: Axam, SMT3IP2/axam2 et SuPr-1. Ces isoformes ont des localisations nucléaires distinctes: Axam serait localisée sur la face nucléaire des pores nucléaires (Zhang *et al.* 2002) alors que Axam2 et SuPr-1 seraient elles localisées dans le cytoplasme et les corps

PML (Nishida *et al.* 2001 ; Best *et al.* 2002).

### **I-3-2-B) Deuxième famille: SENP3 et SENP5**

La seconde famille est constituée de SENP3 et SENP5 qui sont localisées toutes deux dans le nucléole et montrent une préférence à désuimoyler les protéines conjuguées à SUMO-2/3 (Di Bacco *et al.* 2006 ; Gong et Yeh, 2006 ; Nishida *et al.* 2000). Leur localisation nucléolaire suggère que ces 2 enzymes pourraient jouer un rôle crucial dans la biogénèse des ribosomes. Le domaine catalytique de SENP3 est identique à 62% à celui de SENP5. Bien que ces deux protéines présentent des caractéristiques biochimiques communes et des séquences similaires, elles ne sont pas fonctionnellement redondantes.

De récentes découvertes viennent confirmer cette hypothèse. En effet, SENP3 interagit de façon spécifique avec la nucleophosmine NPM1 (un facteur clef dans la biogénèse des ribosomes), conduisant à la désuimoylation des conjugués NPM1-SUMO2 (Haindl *et al.* 2008). De plus, cet article montre qu'une diminution de l'expression de SENP3 dans les cellules par siRNA conduit à des défauts majeurs dans la biogénèse des ribosomes similaires à ceux obtenus lorsque NPM1 est inactivée. L'activité de SENP3 est régulée via le contrôle de sa stabilité (Yan *et al.* 2010). Dans les conditions cellulaires normales, SENP3 est rapidement ubiquitinée et dégradée par le système ubiquitine/protéasome (Kuo M, 2008). Cependant, dans des conditions cellulaires où il y a génération de ROS, SENP3 est stabilisée et relocalisée des nucléoles vers le nucléoplasme, conduisant à la désuimoylation de p300, un coactivateur du facteur de transcription HIF1 (**Hypoxia Inducible Factor 1  $\alpha$** ) qui régule l'expression de gènes impliqués dans le stress cellulaire, stimulant ainsi l'activité co-activatrice de p300 (Huang *et al.* 2009).

Contrairement à SENP1 et SENP2, SENP5 n'est capable de maturer que l'isoforme SUMO-3 (Di Bacco *et al.* 2006). Bien qu'elle montre une préférence à désuimoyler SUMO2/3, elle est tout de même capable de déconjuguer SUMO-1 sur la protéine PML mais uniquement lorsque SUMO-1 est conjugué sur la lysine 65, mais pas sur les lysines 160 et 490, suggérant que sa spécificité pour la déconjugaison des isoformes de SUMO est également conférée par la position de ces isoformes sur certains résidus lysine (Xu *et al.* 2009). Bien qu'elle soit essentiellement nucléolaire (ses 185 premiers acides aminés sont impliqués dans cette localisation), SENP5 a récemment été décrite dans le cytoplasme (Zunino *et al.* 2007).

La suppression de l'expression de SENP5 par siRNA dans les cellules HeLa inhibe la prolifération cellulaire et conduit à l'apparition de cellules binucléées, suggérant que SENP5 serait crucial dans la mitose et/ ou la cytokinèse (Di Bacco *et al.* 2006).

SENP5 serait également impliquée dans la régulation de la morphologie et du métabolisme des mitochondries (Zunino *et al.* 2007 ; Zunino *et al.* 2009). En effet, puisque d'une part, les cellules dans lesquelles le taux d'expression de SENP5 a été fortement diminué par siRNA présentent des anomalies mitochondriales. Et d'autre part, la sur-expression de SENP5 dans les cellules Cos7 conduit à une désuimoylation des protéines mitochondriales conjuguées à SUMO-1, en particulier celle de DRP1 (**Dynamin Related Protein 1**), limitant ainsi la fragmentation mitochondriale induite lors d'une sur-expression de SUMO-1.

Une implication de SENP5 dans la biogénèse des ribosomes a également été reportée. Contrairement à SENP3, SENP5 ne régule pas le taux de sumoylation de NPM1. Par contre, l'inactivation de l'expression de SENP5 par siRNA conduit à une augmentation du taux d'ARN ribosomique 47S (Haindl *et al.* 2008).

### I-3-2-C) Troisième famille: SENP6 et SENP7

La troisième famille est constituée de SENP6 et SENP7 qui ont également une préférence pour les isoformes SUMO-2/3 et qui ont une insertion d'environ 80 acides aminés dans leur domaine catalytique par rapport aux autres SENPs (Figure 9). Actuellement, la fonctionnalité de cette insertion n'a pas été caractérisée.

Toutes deux ne présentent aucune capacité à maturer une quelconque isoforme de SUMO, elles n'ont pas en effet d'activité hydrolase (Mukhopadhyay *et al.* 2006 ; Lima et Reverter, 2008). Par contre, elles ont toutes les deux une forte capacité à cliver les chaînes de polysumoylation des isoformes SUMO-2/3 (Xu *et al.* 2009) et présentent une faible activité de désomoylation sur les substrats conjugués à SUMO-1. Par contre, SENP6 peut cliver les chaînes mixtes de polysumoylation qui se terminent par une molécule de SUMO-1 (Hattersley N *et al.* 2011).

Cependant, les données concernant les fonctions biologiques précises de ces deux SUMO protéases sont actuellement très mal connues. Récemment, SENP6 a été impliquée dans la régulation de l'assemblage des kinétochores via la désomoylation de protéines centromériques (Mukhopadhyay *et al.* 2010) ainsi que dans la formation des corps nucléaire PML (Hattersley *et al.* 2011). L'inactivation de l'expression de SENP7 par siRNA conduit à une accumulation de protéines conjuguées à SUMO-2/3 dont les protéines PML (Shen *et al.* 2009).

Alors que la localisation dans le nucléoplasme de SENP7 semble être clairement définie (Shen *et al.* 2009), la localisation cellulaire de SENP6 est quand à elle soumise à controverse. En effet, initialement SENP6 a été décrite comme ayant une localisation cytoplasmique (Kim *et al.* 2000) alors que d'autres études plus récentes indiquent que SENP6 serait nucléaire (Mukhopadhyay *et al.* 2006 ; Xu *et al.* 2009). Comme nous le verrons plus en détail dans le chapitre II-2-2-D SENP6 a la particularité de désomoyler le récepteur à l'acide rétinoïque RXR $\alpha$  conjugué à SUMO-1 et de réguler son activité transcriptionnelle (Xu *et al.* 2009).

## I-4 Conséquences moléculaires de la sumoylation

### I-4-1 Généralités

D'un point de vue moléculaire, la sumoylation modifie la surface de la protéine, et ainsi influence les interactions de la protéine cible avec les autres macromolécules. Les conséquences de la sumoylation pour une protéine cible sont donc impossibles à prévoir. La sumoylation pourrait avoir trois principales conséquences : **1)** masquer un site d'interaction (par exemple la sumoylation de l'enzyme de conjugaison E2-25k de l'ubiquitine inhibe son interaction avec l'enzyme E1 de l'ubiquitine ce qui entraîne une baisse de sa capacité à conjuguer l'ubiquitine aux protéines cibles. **2)** découvrir un site d'interaction au niveau de la protéine cible suite à un changement conformationnel de cette dernière (par exemple la sumoylation de RanGAP1 promeut son interaction avec RanBP2 et sa relocalisation du cytosol vers les pores nucléaires) et **3)** ajouter une nouvelle interface d'interaction au niveau de la protéine SUMO elle-même conduisant au recrutement de nouveaux partenaires de manière sumoylation-dépendante (par exemple

pour la thymine-DNA glycosylase). Ce dernier point est abordé plus en détail dans le chapitre suivant.

## I-4-2 Partenaires protéiques de la protéine sumoylée interagissant avec SUMO : implication des motifs SIM

### I-4-2-A) Généralités

Récemment, un nombre croissant de protéines interagissant de manière non covalentes avec SUMO et/ou les chaînes de polysumoylation ont été décrites (Kerscher, 2007). Ce processus est analogue au processus d'ubiquitination pour lequel des ubiquitin binding protein ont été décrites (Hurley *et al.* 2006), cependant les motifs de reconnaissance sont différents dans les deux systèmes. Un motif court a été identifié dans les protéines qui interagissaient de façon non covalente avec SUMO: le motif SIM/SBM (**S**UMO-**I**nteracting **M**otifs, **S**UMO-**B**inding **D**omain) (Hannich *et al.* 2005 ; Hecker *et al.* 2006). Ce motif est constitué d'un cœur hydrophobe suivi d'acides aminés chargés négativement ou d'un résidu serine phosphorylé (qui tient lieu d'acide aminé chargé négativement): ce qui est par exemple le cas chez PIASx dont le SIM est phosphorylé *in vivo* par la Caséine Kinase 2 (CK2) (Hecker *et al.* 2006 ; Song *et al.* 2005) ainsi que de PML (Gareau et Lima, 2010) ou encore Daxx. Dans le cas où le SIM est phosphorylé, ce sont les résidus serine situés en C terminal du motif SIM qui sont phosphorylés. Cette phosphorylation pourrait augmenter le nombre de charges négatives, ce qui facilite l'interaction avec SUMO (Stehmeier et Muller, 2009).

La séquence consensus actuellement définie pour le cœur hydrophobe de ce motif SIM est : V/I/L-X-V/I/L-V/I/L où X est un acide aminé quelconque (Kerscher Olivier, 2007). Les acides aminés qui sont de part et d'autre de ce cœur hydrophobe jouent un rôle crucial pour l'interaction avec SUMO (Hecker *et al.* 2006).

Les SIMs peuvent changer l'activité et/ou la localisation des substrats (Gareau et Lima, 2010).

### I-4-2 B) Identification de protéines interagissant de manière non covalente avec SUMO : les SBP (Sumo Binding Proteins)

Ces dernières années une vingtaine de protéines ont été décrites comme possédant ce motif incluant l'enzyme de conjugaison UBC9, TOPORS, et quatre membres de la famille des PIAS qui ont été précédemment montré comme interagissant avec SUMO-1 ou SUMO 2/3 (Minty *et al.* 2000 ; Song *et al.* 2004 ; Weger *et al.* 2003).

Le SIM en N terminal de UBC9 est impliqué dans une interaction non covalente avec SUMO-1 et 2, et ceci avec la même affinité (Tatham *et al.* 2003 ; Knipscheer, 2008). L'interaction entre SUMO et UBC9 induit la formation de chaînes polysumoylées sur les protéines cibles comme Sp100 ou HDAC4. En effet, il a été démontré que lorsque UBC9 est muté sur ses SIM, sa liaison thioester avec SUMO n'est pas affectée, cependant on observe une forte diminution des chaînes polysumoylées SUMO-2 sur de nombreux substrats (Tatham *et al.* 2003 ; Knipscheer *et al.* 2008).

UBC9 est de plus autosumoylée (sur la lysine 14 chez les mammifères sur un site non consensus et la lysine 153 chez la levure) (Knipscheer *et al.* 2008). La protéine Rhes

(Ras Homologue Enriched in the Striatum) qui fait partie de la famille des protéines G, augmente cette autosumoylation en se liant à E1 et à UBC9 et en facilitant le transfert de SUMO lié à E1 sur la lysine d'UBC9 (Subramaniam *et al.* 2010).

SUMO ainsi lié à UBC9 augmente son activité de conjugaison avec les protéines qui contiennent des SIMs telles que Sp100, ou encore IE2.

Des études du SIM de PIAS ont montré que la petite région hydrophobe de la séquence SIM est déterminante pour la reconnaissance de SUMO et qu'elle pouvait se lier de manière parallèle ou anti-parallèle à SUMO (Hecker *et al.* 2006).

De plus, le SIM de PIASx est phosphorylé *in vivo*. Cette phosphorylation module positivement l'interaction avec SUMO-1 (rendant la conformation plus favorable à l'interaction) alors qu'elle ne change rien à celle avec SUMO-2 (Hecker *et al.* 2006).

Le SIM de PML est nécessaire pour sa nucléation mais également pour la formation des corps PML (Shen *et al.* 2006 ; Llaemend-breitenbach *et al.* 2008 ; Tatham *et al.* 2008). L'un des constituants de ces corps PML, la protéine Daxx contient également un motif SIM. Lorsque celui-ci est muté, Daxx perd son activité répressive (Kuo *et al.* 2005 ; Geiss-Friedlander et Melchior, 2007). De plus, le motif SIM de Daxx est phosphorylé par CK2, ce qui amplifie l'affinité entre Daxx et SUMO-1, ce qui entraîne donc une augmentation de la sumoylation de Daxx et sa capacité à lier des facteurs sumoylés. Cette phosphorylation augmente l'association Daxx-PML, ce qui induit l'apoptose (Chang *et al.* 2011).

#### I-4-2-C) Recrutement des ubiquitine E3 ligases sur les protéines sumoylées

Certaines ubiquitines E3 ligases ont été montrées comme possédant un motif SIM. La première identifiée est Rfp chez *Schizosaccharomyces. Pombe* qui contient un double motif SIM (Sun H *et al.* 2007).

C'est aussi le cas pour RNF4, une protéine de mammifère. RNF4 se fixe grâce à ses quatre SIMs sur les chaînes de polysumoylation. Elle va pouvoir ensuite induire la polyubiquitination de la protéine sumoylée car elle possède un motif RING. Le cas de RNF4 sera repris plus en détail dans le chapitre inter-relation entre l'ubiquitination et la sumoylation (Gareau et Lima, 2010).

Cette interaction protéine-SUMO via les motifs SIM est régulée suite aux processus de sumoylation/désomoylation des protéines, et c'est donc un autre moyen de réguler rapidement et finement les fonctions cellulaires en réponse à des stimuli extracellulaires.

### I-5 Conséquences fonctionnelles de la sumoylation

#### 1-5-1 Impact fonctionnel de la sumoylation des protéines

Les protéines sumoylées forment un spectre large : ce sont aussi bien des protéines nucléaires que cytoplasmiques ou encore membranaires. On ne sait pas encore bien quelle est l'étendue de la sumoylation ni combien de protéines sont ciblées par cette modification post-traductionnelle. En effet le nombre de protéines sumoylées ne cesse d'augmenter : on en connaît aujourd'hui des centaines (Denison *et al.* 2005 ; Wohlschlegel *et al.* 2004). Beaucoup de ces protéines cibles ont été d'abord identifiées dans le noyau (facteurs et

cofacteurs de transcription, protéines impliquées dans l'intégrité du génome, protéines concentrées dans les corps nucléaires, protéines du pore nucléaire etc.), mais il est maintenant clair que la sumoylation régule également des protéines localisées dans le cytoplasme, impliquées dans les voies de signalisation, mais également des protéines membranaires (Bossis et Melchior, 2006). Bien que le nombre de protéines sumoylées soit en constante évolution, les conséquences fonctionnelles de la sumoylation ainsi que l'instant et l'endroit où elle a lieu ne sont, quant à eux, pas toujours bien connus pour tous les substrats identifiés.

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, la sumoylation joue un rôle clef dans la régulation des interactions physiques. Les conséquences de la sumoylation sont nombreuses et divergent en fonction de la nature du substrat qui subit la modification. Dans ce chapitre, je parlerai uniquement des principales modifications fonctionnelles et de quelques exemples pour les illustrer.

Les conséquences fonctionnelles de la sumoylation des récepteurs nucléaires, en particulier celles du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  et du récepteur aux rétinoïdes RXR $\alpha$ , seront développées dans la seconde partie de mon rapport.

La sumoylation favorise ou inhibe les interactions protéine-protéine, c'est par exemple le cas de RanBP2 qui se lie à RanGAP (Miteva *et al.* 2010). Elle module également l'activité des facteurs de transcription, tels que p53, C-jun, ainsi que l'import nucléaire : RanGAP1 non modifié est cytoplasmique, lorsqu'il est modifié par SUMO-1 sur la lysine 526, il est exporté vers le NPC (Nuclear Pore Complex) (Hay, 2005). La sumoylation module également la structure de la chromatine : la sumoylation des HDAC provoque une répression transcriptionnelle des gènes cibles (Yeh, 2009 ; Scognamiglio *et al.* 2008), Enfin elle module la localisation subnucléaire, c'est le cas de p73, PML. La sumoylation peut être également un antagoniste de l'ubiquitination et donc favoriser la stabilité des protéines (ex : I $\kappa$ B) (Desterro, 1998). Par contre, elle peut également conduire à la dégradation des protéines, comme cela a été montré pour PML et HIF1 (Tatham *et al.* 2008).

De ce fait, le processus de sumoylation va avoir des répercussions au niveau des processus cellulaires tels que la réplication cellulaire, la signalisation cellulaire, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la carcinogénèse, la différenciation etc.... (Deyrieux *et al.* 2007).

### 1-5-2 Impact KO enzymes sumoylation : conséquences physiologiques et importance du processus de sumoylation

Les études génétiques ont permis d'associer le processus de sumoylation des protéines à des fonctions critiques, aussi bien au niveau cellulaire, qu'au niveau de l'organisme et démontrent clairement qu'une régulation très fine de la sumoylation/désomoylation des protéines est requise pour que le développement embryonnaire puisse se faire correctement.

Des études menées en 2006 ont montré que le KO de SUMO-1 engendrait chez des patients humains des déformations : leurs lèvres et leurs palais sont fendus (Alkuraya *et al.* 2006). Il a également été montré que lorsque SUMO-1 était déficient, ceci n'entraînait pas la létalité embryonnaire chez la souris. En effet SUMO-2 et/ou SUMO-3 pourraient compenser SUMO-1 (Zhang *et al.* 2008).

Des études réalisées chez *Caenorhabditis elegans*, *Schistosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* suggèrent également un rôle essentiel de SUMO-1 dans la croissance cellulaire, et dans les évènements associés à la mitose tels que la formation des centromères et des kinétochores, la ségrégation des chromosomes et la séparation des chromatides.

Chez *Schistosaccharomyces pombe*, l'hétérodimère AOS1/UBA2 (enzyme E1 d'activation), est essentielle pour la transition G2/M du cycle cellulaire (Dohmen *et al.* 1995 ; Johnson *et al.* 1997). Et l'ablation de UBA2 chez *Caenorhabditis elegans* conduit à une létalité embryonnaire (Jones *et al.* 2002).

L'enzyme E2 de sumoylation, UBC9, joue un rôle très important dans le processus de sumoylation. En effet, étant la seule enzyme de conjugaison, son knockdown ou son knockout bloque toute conjugaison entre le substrat et la famille SUMO (SUMO1, 2/3). De nombreuses études montrent que cette enzyme joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, et que ce rôle est conservé au cours de l'évolution. En effet, le knockout d'UBC9 conduit à une létalité embryonnaire sévère juste après le développement blastocyste qui est dû à une mauvaise condensation et séparation des chromosomes et à une organisation nucléaire aberrante (Nacerddine *et al.* 2005). La perte de fonction d'UBC9 conduit également à une létalité embryonnaire chez *Caenorhabditis elegans*, à un arrêt en phase G2/M chez *Saccharomyces cerevisiae*, et à des défauts de méiose chez *Drosophila Melanogaster* (Hayashi *et al.* 2002 ; Seufert *et al.* 1995 ; Tanaka *et al.* 1999).

De plus, la perte d'UBC9 chez la souris adulte, affecte principalement l'intestin grêle. En effet, la perte de la sumoylation cause le détachement des entérocytes (cellules qui font partie de l'épithélium intestinal) de la lame basale (Demarque *et al.* 2011).

D'un autre côté, une sumoylation excessive des protéines suite au KO de SENP1 ou SENP2 est aussi létal au niveau embryonnaire (Cheng *et al.* 2007 ; Chiu *et al.* 2008 ; Kang *et al.* 2010). En effet, les embryons de souris de génotype SENP1 *-/-* développent une sévère anémie fœtale et meurent au cours de la gestation (Cheng *et al.* 2007). En ce qui concerne les embryons de souris SENP2*-/-*, ils meurent plus tôt que ceux qui sont de génotype SENP1 *-/-* (respectivement à 9,5 jours du stade embryonnaire contre 13,5 jours) (Cheng *et al.* 2007). Les embryons (SENP1 *-/-*) sont déficients en érythropoïétine (un facteur de croissance des précurseurs des globules rouges) ce qui provoque une anémie. La perte d'expression de SENP2 dans les cellules MEF (**m**ouse **e**mbyronic **f**ibroblast) inhibe la progression du cycle cellulaire, en particulier la transition G1/S (Chiu *et al.* 2008). De plus une autre étude a démontré que cette perte d'expression provoquait chez la souris une réduction de l'expression des protéines GATA4 et GATA6 qui sont essentielles au développement cardiaque. En effet, SENP2 ne peut plus désomoyler le complexe Pc2/CBX4, qui alors s'accumule et se fixe sur les promoteurs des gènes cibles PcG et qui mène à la répression transcriptionnelle de GATA4 et GATA6 (Kang *et al.* 2010). Une étude a montré que lorsque SENP2 est absent, Mdm2 ne peut plus être désomoylé, il reste donc prisonnier dans le noyau, où il est incapable de pouvoir promouvoir la dégradation de p53. p53 s'accumule alors dans les cellules et cause l'arrêt de la croissance cellulaire (Sedwick *et al.* 2008). De plus, SENP2 est fortement exprimé dans les cellules du trophoblaste qui sont nécessaires à la formation du placenta. Lorsque cette protéine est absente, on observe une perturbation de la voie p53-Mdm2, ce qui affecte la croissance des trophoblastes (Chiu *et al.* 2008).

La délétion de SENP5 par SiRNA dans les cellules, entraîne une augmentation des niveaux de SUMO-1 et SUMO 2/3 conjugués, l'arrêt du cycle cellulaire, des défauts de la morphologie nucléaire et l'apparition de cellules binuclées, ce qui révèle un rôle essentiel de SENP5 dans la mitose et/ ou la cytokinèse (DiBacco *et al.* 2006).

La déplétion de SENP6 par SiRNA dans les cellules HeLa conduit à la dégradation de CENP-1, la protéine des kinétochores, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort des cellules. En effet, CENP-1 lorsqu'il est sumoylé, conduit au recrutement de l'ubiquitine ligase RNF4, ce qui entraîne sa polyubiquitination et ainsi sa dégradation par le protéasome. SENP6 stabilise donc la protéine CENP-1 en la désumoylant (Hattersley *et al.* 2011 ; Mukhopadhyay *et al.* 2010).

## I-6 Régulation du processus de sumoylation

Comme nous venons de le voir, le processus de sumoylation joue un rôle clef dans la régulation de l'activité des protéines cellulaires.

Bien que très peu de protéines soient sumoylées, l'équilibre entre protéines sumoylées et désumoylées est très important. De plus, bien que le nombre de protéine sumoylée ne cesse d'augmenter, on ne sait pas la plupart du temps ce qui induit la sumoylation et/ou la désumoylation de ces substrats (on ne connaît pas l'élément déclencheur). Et comme la sumoylation est un processus dynamique, l'activation ou l'inhibition de cette voie va avoir un impact sur les événements cellulaires. Des déséquilibres ont été associés à des pathologies dont les cancers, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiovasculaires (Seeler et Dejan, 2003 ; Liu et Shuai, 2008 ; Wang *et al.* 2007).

Nous ne citerons que quelques exemples clefs de l'implication du processus de sumoylation dans la cancérogénèse, car ils sont nombreux. Etant donné que de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs sont sumoylés, il est clair que toute dérégulation de ce processus va réguler la progression tumorale. Il a été montré une surexpression d'UBC9 dans les cancers de l'ovaire, de la prostate et les adénocarcinomes, et la surexpression d'UBC9 facilite la croissance des cellules cancéreuses (McDoniels-Silvers *et al.* 2002 ; Mo *et al.* 2005). La SUMO-E3 ligase PIAS3 est sur-exprimée dans divers types de cancers (Wang *et al.* 2004), et un faible taux de l'enzyme E1 a été associé à un faible taux de survie chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Lee *et al.* 2004). Une sur-expression de SENP1 a été observée dans le cancer de la prostate.

Afin de maintenir cet équilibre fragile, ce processus est donc hautement régulé et nous allons évoquer dans ce chapitre les principaux éléments de régulation actuellement décrits.

En général, la régulation d'un processus biologique peut se faire à différents niveaux : **1)** contrôler le niveau d'expression des enzymes impliqués dans le processus (contrôle transcriptionnel) ; **2)** contrôler l'activité de ces enzymes ; **3)** réguler les interactions protéine-protéine ; **4)** modifier la localisation subcellulaire des différents intervenants.

### I-6-1 Par les stress cellulaires

Les premières études indiquant une régulation du processus de sumoylation par les stress cellulaires viennent de Saitoh et Hinchev (2000) qui démontrent que divers stress cellulaires (stress osmotique et oxydatifs, choc thermique) augmentent globalement la conjugaison de SUMO2/3 sur les protéines cellulaires, mais n'ont aucun effet sur la conjugaison de SUMO1. Par contre, lorsque l'on ne regarde plus cette fois-ci de manière

globale mais plutôt en fonction de la nature des substrats sumoylés, on s'aperçoit que les choses sont beaucoup moins simples et que l'état de sumoylation dépend de la nature du stress, de la durée et de l'intensité de ce stress.

#### I-6-1-A) Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est l'un des principaux types d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées, les ROS, telles que  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  et  $\cdot OH$ . Ces ROS sont constamment produits dans le corps humain durant les réactions métaboliques, et ne constituent pas en soi une situation de stress oxydant car la cellule dispose d'un système complexe de détoxification. Le stress oxydant devient pathologique dès que le système de protection est submergé par les ROS. Ces ROS sont également générés après exposition aux UV, aux radiations ionisantes, aux agents chimio thérapeutique.

Dans le processus de sumoylation, les résidus cystéines (et plus particulièrement la fonction thiol de leur chaîne latérale qui est sensible aux processus de réduction) des enzymes sont essentiels dans la réaction de conjugaison de SUMO puisque des liaisons thioesters sont formées entre E1 et SUMO et également entre E2 et SUMO.

Une faible concentration en  $H_2O_2$  (< 1 mM) inhibe globalement *in vivo* la conjugaison de SUMO1 et SUMO2 (Bossis et Melchior, 2006). Cela est dû à la formation d'un pont dissulfide entre les cystéines catalytique de l'enzyme activatrice E1 (UBA2) et l'enzyme de conjugaison E2 (UBC9) *in vivo* en présence de 1 mM  $H_2O_2$  (Bossis et Melchior, 2006), inhibant de ce fait la formation des intermédiaires E1-SUMO et E2-SUMO car ces deux enzymes deviennent inactives. Ceci est vraiment spécifique de la sumoylation car l'ubiquitination, elle, reste inchangée. C'est par exemple le cas de c-Fos et c-Jun (composants du complexe transcriptionnel AP-1 et cibles de la sumoylation) qui sont complètement désomoylés au bout de 5 min de traitement à l' $H_2O_2$ , ce qui conduit à une augmentation de leur activité transcriptionnelle (Bossis et Melchior, 2006). Et on sait que ces 2 facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de l'expression de protéines anti-oxydantes (Gius *et al.* 1999); donc leur rapide désomoylation serait un moyen rapide pour la cellule de répondre le plus rapidement possible au stress oxydatif.

Par contre, dans des conditions de stress oxydatif élevées, 10 ou 100 mM, il a été largement rapporté une augmentation globale de l'état de sumoylation des protéines cellulaires (Manza *et al.* 2004 ; Saitoh et Hinchey, 2000 ; Zhou *et al.* 2004). C'est le cas pour MAPK/ERK5 dont la sumoylation est induite par un taux élevé de  $H_2O_2$ , entraînant une baisse de son activité transcriptionnelle. De plus, dans les cellules HEK293, le traitement par  $H_2O_2$  induit une augmentation du taux de protéine p53 conjugué à SUMO2/3 alors que son taux conjugué à SUMO1 reste inchangé (XU *et al.* 2009). Cet état de sumoylation général augmenté a été corrélé à une inhibition de l'activité des SENPs qui ont subi, suite à l'action de  $H_2O_2$ , la formation d'un pont disulfure intra ou intermoléculaire (Bossis and Melchior, 2006) au niveau de leurs résidus cystéines qui font partie de leur site catalytique, induisant ainsi la formation de dimères inactifs de protéines SENPs (Xu *et al.* 2008).

Il est bon de noter que ces conditions extrêmes de stress ne sont jamais retrouvées aussi bien dans des conditions physiologiques que pathologiques.

**Le Nitric Oxyde (NO, qui induit également des stress oxydatifs), induit de manière globale une désomoylation des protéines cellulaires en induisant l'ubiquitination puis la dégradation de la SUMO-E3 ligase PIAS3 (Qu *et al.* 2007).**

#### I-6-1-B) L'hypoxie

De manière générale, l'état de sumoylation des protéines cellulaires est augmenté lors d'une hypoxie (Comerford *et al.* 2003). Ceci est principalement dû au fait que l'hypoxie augmente la transcription du gène SUMO-1.

De plus, l'hypoxie stimule l'expression de RSUME (**R**WD-containing **sum**oylation **enhancer**), qui est un stimulateur général de la conjugaison de SUMO-1, SUMO2 et SUMO3 via son interaction avec UBC9 (Carbia-Nagashima *et al.* 2007 ; Castro *et al.* 2003). RSUME favorise l'interaction non covalente de SUMO et UBC9, ce qui stimule la formation de la liaison thioester UBC9-SUMO et la conjugaison de SUMO sur les protéines cibles.

SENP1 joue un rôle important dans la réponse cellulaire à l'hypoxie : il désumoyle HIF1 (HIF1 : régulateur transcriptionnel central de la réponse de la cellule en cas d'hypoxie), ce qui permet non seulement de stabiliser cette protéine mais également de stimuler son activité transcriptionnelle. Car HIF1 sumoylé interagit avec une ubiquitine E3 ligase et est dégradé (Ulrich, 2007 ; Huang *et al.* 1998 ; Ivan *et al.* 2001).

Une étude récente montre que l'hypoxie empêche la désumoylation des chaînes polysumo2/3 de IB sur la lysine 48 en bloquant l'activité des SENPs, ce qui empêcherait l'ubiquitination et donc la dégradation de ce facteur qui est ubiquitiné sur le même site, conduisant à l'activation de la voie NFB (Culver *et al.* 2011).

#### **I-6-1-C) Le Choc thermique**

Chez les mammifères, l'une des conséquences majeures du choc thermique est l'activation des facteurs de choc thermique (HSF : **H**eat **S**hock **F**actor) qui vont activer la transcription de gènes codant pour des protéines chaperones (appelées HSP pour **H**eat **S**hock **P**rotein) qui vont venir protéger les fonctions cellulaires (Morimoto, 1998 ; Morimoto, 2008). Globalement, les chocs thermiques stimulent la conjugaison des isoformes SUMO-2/3 sur les protéines cellulaires et non celle de SUMO-1 (Saitoh *et al.* 2000 ; Golebiowski *et al.* 2009 ; Flick *et al.* 2009 ; Brunet-Simioni *et al.* 2009). Récemment, il a été démontré que les chocs thermiques induisent la multi et la polysumoylation de PARP-1 (**P**oly (**A**DP-**R**ibose) **P**olymerase **1**) par PIASy, conduisant à un recrutement de l'ubiquitine E3 ligase RNF4, à son ubiquitination et sa dégradation (Martine *et al.* 2009).

#### **I-6-1-D) Le Stress génotoxique**

Les stress génotoxiques sont induits par les agents chimiothérapeutiques, les radiations ionisantes et les radiations UV. Ils peuvent stimuler ou inhiber le processus de sumoylation, cela est substrat spécifique.

#### **I-6-2) Par les protéines virales**

L'un des moyens les plus efficaces de moduler le processus de sumoylation, c'est de directement toucher à l'activité des enzymes qui interviennent dans le processus de sumoylation/désomoylation. C'est cette stratégie qui a été adoptée par divers virus.

Il a été clairement démontré que certaines protéines virales dont celles du **C**yto**M**égalo**V**irus (CMV), de l'**H**erpes **S**implex **V**irus (HSV) et de l'adénovirus répriment la sumoylation de substrats cellulaires spécifiques (Muller et Dejean, 1999 ; Ledl *et al.* 2005 ; Parkinson et Everett, 2000). Cependant, pour tous ces cas de figure, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas bien connus.

L'un des exemples les plus documenté que l'on ait est le rôle de la protéine Gam1 de l'adénovirus aviaire de serotype 1 (ou CELO : chicken embryo lethal orphan) (Boggio *et al.* 2004). Gam1 est essentielle pour la réplication du virus car elle stimule la transcription de nombreux promoteurs eucaryotes afin de créer un environnement plus favorable pour la réplication virale. Gam1 diminue fortement le taux de sumoylation des protéines cellulaires. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de manière générale, le processus de sumoylation a un impact négatif sur la transcription des gènes et la transduction du signal. Donc, en bloquant le processus de sumoylation, l'adénovirus CELO stimule les capacités transcriptionnelles de la cellule au profit de sa propre propagation. Gam 1 bloque la formation du lien thioester entre la protéine E1 et SUMO en se fixant sur E1 et en bloquant directement son activité enzymatique (Boggio *et al.* 2004). La conséquence directe de cette interaction est le recrutement d'ubiquitines ligases au niveau de E1, conduisant à sa polyubiquitination et à sa dégradation (Boggio *et al.* 2007 ; Boggio *et al.* 2006). Gam1 induirait également la dégradation de l'enzyme E2 UBC9, cependant, le mécanisme moléculaire induisant cette dégradation n'a pas encore été décrit (Boggio *et al.* 2004). On observe donc en final une diminution globale du processus de sumoylation.

### **I-7) Inter-relations entre la sumoylation et les autres modifications post-traductionnelles**

Une protéine peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles qui peuvent se dérouler en même temps ou de manière séquentielle soit sur des résidus cibles différents, soit parfois sur les mêmes résidus. Les inter-relations entre ces différentes modifications post-traductionnelles peuvent être positives comme négatives. Un crosstalk positif est défini comme une situation dans laquelle une modification post-traductionnelle sert de signal pour l'ajout ou le retrait d'une autre modification post traductionnelle. Alors que le cross-talk négatif est décrit lorsqu'il y a une concurrence directe pour la modification du même acide aminé, ou des effets indirects dans lesquels l'une des modifications masque le site de reconnaissance pour une deuxième modification post-traductionnelle. Il est bon de noter que les résidus lysine servent de plateforme pour de nombreuses modifications post-traductionnelles telles qu'entre autre l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation et la méthylation. Il est donc évident que les modifications post-traductionnelles qui touchent le même résidu lysine seront mutuellement exclusives, générant ainsi un grand potentiel d'inter-relations. Ces inter-relations sont également un moyen de réguler le processus de sumoylation.

#### **I-7-1) La sumoylation et l'ubiquitination**

##### **I-7-1-A) Similitudes et différences entre les processus de sumoylation et d'ubiquitination**

De nombreux parallèles peuvent être faits entre la sumoylation et l'ubiquitination. Tout d'abord, la sumoylation et l'ubiquitination touchent toutes deux une lysine. De plus SUMO et l'ubiquitine ont une structure tridimensionnelle très similaire bien que leur séquence ne présente que 18% d'identité. En outre comme nous l'avons déjà vu, la cascade enzymatique de la sumoylation est très proche de celle de l'ubiquitination (voir chapitre I-2). Enfin, ces deux processus sont tous deux réversible : un recyclage a lieu via

l'action des isopeptidases, SUMO et l'ubiquitine sont donc clivés de leur substrat.

Cependant, les conséquences biologiques de ces deux processus sont très divergentes. En effet, contrairement à la polyubiquitination, la sumoylation ne conduit pas toujours à la dégradation des protéines. Sa première fonction est de modifier l'activité ou la fonction du substrat. Il est à noter cependant, que les chaînes polyubiquitinées ne conduisent pas toujours à la dégradation des protéines : cela dépend du résidu lysine ciblé. La poly-ubiquitination sur la lysine 48 entraîne essentiellement la dégradation de la protéine cible par le protéasome 26S. Par contre si elle a lieu sur la lysine 63, la protéine n'est pas dégradée. La poly-ubiquitination régule donc dans ce cas là son activité et elle module également de nombreux processus cellulaires, tels que la réparation de l'ADN, l'endocytose et l'export nucléaire. De plus la monoubiquitination ne conduit pas à la dégradation, elle permet notamment la régulation de l'activité de la protéine et de sa localisation subcellulaire. En outre l'ubiquitine ne possède qu'une seule forme alors que la sumoylation comporte quant à elle 3 isoformes. On peut distinguer également d'autres différences, notamment au niveau des enzymes. Le processus d'ubiquitination contient deux formes simples de E1, un grand nombre d'enzyme E2 et plusieurs centaines d'enzymes E3 tandis que la sumoylation comporte quant à elle, une enzyme E1 qui est un hétérodimère, une seule enzyme E2 et quelques enzymes E3 (moins d'une dizaine à l'heure actuelle) avec une spécificité de substrat.

#### I-7-1-B) Ubiquitination et sumoylation des mêmes substrats

Beaucoup de protéines sont les substrats de la sumoylation et de l'ubiquitination, souvent sur le même résidu lysine, ce qui laisse à penser que ces deux modifications post traductionnelles agissent de façon antagoniste. Cet antagonisme a d'abord été reporté pour I $\kappa$ -B $\alpha$  (inhibiteur de NF-B) qui peut être poly-ubiquitiné ou mono sumoylé sur la lysine 21 (Desterro *et al.* 1998). L'ubiquitination de I $\kappa$ -B $\alpha$  conduit à sa dégradation et donc à l'activation de la voie NF-B, alors que sa sumoylation le stabilise et inhibe donc cette voie (Desterro *et al.* 1998).

Actuellement, il est clair que les inter-relations entre le processus de sumoylation et d'ubiquitination sont beaucoup plus complexes et dans de nombreux cas, SUMO et l'ubiquitine peuvent agir soit de manière séquentielle soit en concert (dans ce cas là ce ne sont pas les mêmes résidus lysine qui sont touchés) pour réguler l'activité d'une protéine.

Une action séquentielle de ces 2 modifications post-traductionnelles a été rapportée dans le cas de la régulation de l'activité d'un autre composant de la voie de signalisation NFB : la protéine NEMO (NF-B Essential Modulator), protéine régulatrice de la sous unité IKK (IB Kinase). NEMO est sumoylée et ubiquitinée sur les mêmes résidus lysine (K277 et K309), mais de manière séquentielle (Figure N°13). En effet, suite à un stress génotoxique, NEMO est sumoylée par la SUMO E3 ligase PIASy et transloquée dans le noyau où elle pourra être ensuite phosphorylée (Mabb *et al.* 2006). Ensuite, NEMO sera désumoylée et ubiquitinée sur les mêmes résidus lysines, conduisant à l'export nucléaire de NEMO, permettant l'association de NEMO aux sous unités IKK pour former une kinase active (Huang *et al.* 2003).

Une action en concert de SUMO et de l'ubiquitine a été rapportée dans le cas du gène suppresseur de tumeur p53 (Carter *et al.* 2007). Dans ce cas précis, p53 est ubiquitiné par l'ubiquitine E3 ligase MDM2, ce qui conduit au recrutement de la SUMO E3 ligase PIASy et donc à la sumoylation de p53 sur des résidus lysines différents de ceux de l'ubiquitination.

Mais la sumoylation des résidus lysine ne protège pas toujours de la dégradation, il

peut également conduire à la dégradation des protéines comme cela a été décrit pour PML et HIF1 (Tatham *et al.* 2008).

Récemment, l'identification d'ubiquitines ligases qui sont recrutées via les motifs SIM sur les protéines sumoylées, appelées STUBLs (SUMO-targeted ubiquitin ligases), pour venir ubiquitiner ces substrats sumoylés et conduire à leur dégradation par le protéasome 26S a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation des protéines sumoylées. L'exemple le plus documenté à l'heure actuelle est celui de PML (Lallemand-Breitenbach *et al.* 2008 ; Tatham *et al.* 2008). En effet lorsque les cellules sont traitées à l'arsenic, PML est sumoylé sur la lysine 160, conduisant au recrutement de l'ubiquitine E3 ligase RNF4. Comme RNF4 contient 4 motifs SIM, elle va interagir via ses motifs avec la protéine SUMO conjuguée sur PML. Suite à son recrutement et grâce à son motif RING, RNF4 induit ensuite la polyubiquitination de PML, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. (Gareau et Lima, 2010 ; Lallemand-Breitenbach *et al.* 2008).

#### I-7-1-C) : Régulation de l'activité des protéines impliquées dans la cascade enzymatique de ces deux processus

Les inter-relations entre la sumoylation et l'ubiquitination sont également visibles via les modifications que subissent les enzymes impliquées dans la cascade enzymatique de ces deux processus. Par exemple, la sumoylation de l'enzyme E2-25k, une des enzymes E2 dans la voie d'ubiquitination, inhibe sa capacité à se conjuguer à l'ubiquitine (Pichler *et al.* 2005). Dans ce cas précis, la sumoylation inhibe le processus d'ubiquitination médié par cette E2. Un autre exemple dans lequel la sumoylation d'une enzyme du processus d'ubiquitination va conduire à une accumulation de protéines polyubiquitinées a été rapporté pour l'enzyme de déubiquitination USP25 et l'ubiquitine E3 ligase MDM2 qui sont sumoylées et ubiquitinées sur le même résidu lysine (Meulmeester *et al.* 2008 ; Denuc *et al.* 2009 ; Meek et Knippschild, 2003). La sumoylation d'USP25 conduisant à une inhibition de son activité protéase (Meulmeester *et al.* 2008). Par contre, l'ubiquitination de ce même résidu lysine va stimuler son activité protéase, et donc cliver les chaînes de polyubiquitination, conduisant à la stabilisation des substrats cibles (Denuc *et al.* 2009). MDM2 est responsable de l'ubiquitination de p53 et de sa dégradation. La sumoylation de MDM2 inhibe son autoubiquitination, et donc stabilise la protéine et stimule son activité ubiquitine E3 ligase sur p53 (Buschmann *et al.* 2000).

A l'inverse, le processus d'ubiquitination peut également inhiber celui de la sumoylation comme cela a été rapporté dans le cas de Parkin, une ubiquitine E3 ligase impliquée dans la maladie de parkinson, qui ubiquitine la SUMO E3 ligase RanBP2, conduisant à sa dégradation (Um et Chung, 2006). De plus, l'interaction non covalente entre Parkin et SUMO stimule son activité ubiquitine ligase, créant ainsi une boucle rétro-active négative entre les 2 systèmes (Um et Chung, 2006) Les ubiquitines E2 ligases SIAH2 et TRIM32 induisent la dégradation par le protéasome des SUMO E3 ligases PIAS.

#### I-7-2) La sumoylation et l'acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout de groupe fonctionnel acétyl  $\text{COCH}_3$  sur les résidus lysines en position N-terminale ou au sein de la chaîne polypeptidique. Cette modification post-traductionnelle régule de nombreux processus cellulaires en neutralisant la charge positive et en modifiant la taille de la chaîne latérale des résidus lysine ce qui induit un changement de conformation des protéines modifiées et le mode d'interaction avec leur

molécules cibles, en particulier l'ADN qui est chargé négativement (Yang, 2007). L'acétylation est une modification réversible dont le clivage est catalysé par des déacétylases.

#### I-7-2-A) Modification des mêmes substrats

Un nombre de plus en plus élevé de protéines, incluant les facteurs de transcription MEF2A (**m**ycocyte **e**nhan**ce**r **f**actor **2A**) et Sp3, le coactivateur transcriptionnel p300 et le suppresseur de tumeur HIC1 (**H**yper**m**ethylated **I**n **C**ancer **1**) peuvent être modifiés par la sumoylation et l'acétylation sur les mêmes lysines (Sapetschnig *et al.* 2002 ; Bouras *et al.* 2005 ; Shalizi *et al.* 2006; Stankovic-Valentin *et al.* 2007). Dans tous les cas, les modifications agissent de façon antagoniste : elles sont en compétition. En effet il a été montré pour p300 qu'une désacétylation par la déacétylase SIRT1 était préalablement nécessaire pour que la protéine soit sumoylée sur les mêmes résidus lysines (David *et al.* 2002). La sumoylation de p300 réprime son activité transcriptionnelle alors que son acétylation va la stimuler (Yang et Seto, 2008).

#### I-7-2-B) Inter-relation via modification des enzymes impliquées dans ces deux processus

Les HDACs, dont la fonction principale est d'enlever les groupements acetyl, seraient également des SUMO E3s ligases pour certains substrats. En effet, HDAC4 stimule la sumoylation du facteur de transcription MEF2 et du récepteur nucléaire LXR indépendamment de son activité déacétylase (Grégoire et Sand Yang, 2005 ; Lee *et al.* 2009). D'autres HDACs vont stimuler la sumoylation de certains substrats en les déacétylant comme cela a été décrit pour SIRT1 qui déacétyle le coactivateur transcriptionnel p300, conduisant à une augmentation de son état de sumoylation sur les même résidus lysine.

Certaines HDACs sont également elles-mêmes sumoylées : l'activité déacétylase de HDAC1 et HDAC4 est augmentée suite à la conjugaison de SUMO, ce qui engendre une augmentation de leur activité répressive au niveau du processus de transcription (Kirsh *et al.* 2002 ; David *et al.* 2002 ; Cheng *et al.* 2004).

De plus, certaines HDACs interagiraient avec les protéines sumoylées de manière non covalente, conduisant à une déacétylation des protéines environnantes, pouvant expliquer l'effet répresseur du processus de sumoylation. En effet, il a été clairement démontré que l'acétylation des histones est généralement associée à une chromatine transcriptionnellement active, alors que leur déacétylation conduirait à une répression transcriptionnelle. Le facteur de transcription Elk1 sumoylé sur les régions promotrices de ses gènes cibles recruterait HDAC2, induisant localement une déacétylation des histones et une répression de la transcription de ses gènes cibles (Yang et Sharrocks, 2004 ; Yang *et al.* 2003). Le même phénomène vient d'être récemment décrit pour le corégulateur transcriptionnel BRCA1 qui recruterait HDAC1 au niveau des régions promotrices de ses gènes cibles via son interaction non covalente avec SUMO (Park *et al.* 2007).

#### I-7-3) La sumoylation et la méthylation

La méthylation est l'attachement d'un groupement méthyle sur un substrat. Elle peut se faire sur les résidus lysine ou arginine des protéines. A ce jour aucun cross talk

sumoylation et méthylation n'a été mis en évidence. Cependant la méthylation pouvant se faire sur lysine, il se pourrait bien que ces deux modifications post-traductionnelles interagissent ensemble.

#### I-7-4) La sumoylation et la phosphorylation

La phosphorylation des protéines, qui a lieu sur leurs résidus Sérine, thréonine ou tyrosine, joue un rôle clé dans le contrôle de plusieurs voies de signalisation et il est maintenant clair que c'est également un régulateur de la sumoylation. En effet, la phosphorylation peut inhiber ou augmenter la sumoylation, cela dépend des substrats, et d'autre part, la phosphorylation des SUMO E3 ligases et/ou des SENPs va également moduler leur activité et donc indirectement réguler l'état de sumoylation de leur substrat.

#### I-7-4-A) L'état de phosphorylation du substrat régule son état de sumoylation

Dans de nombreux cas décrits dans la littérature, la phosphorylation de nombreux substrats va stimuler leur état de sumoylation (Bossis et Melchior, 2006). Pour ces protéines, le site de phosphorylation est proche de celui de la sumoylation, ce qui a permis de définir une séquence consensus appelée séquence PDSM (**Phosphorylation Dependent Sumoylation Motif**) :  $\psi KxExxSP$  (Hietakangas *et al.* 2006). Cette séquence comprend le motif consensus de sumoylation adjacent à un site de phosphorylation sur serine. La charge négative conférée par la phosphorylation du résidu serine facilite la modification par SUMO des protéines cibles. En effet pour pas mal de facteurs de transcription (HSF1, GATA-1, MEF2A, SNIP-1 et  $ERR\gamma$ ), les auteurs ont démontré que la sérine présente dans la séquence PSDM augmente leur sumoylation (Hietakangas *et al.* 2006) (Figure 17). Cela a d'abord été démontré pour le facteur de choc thermique HSF1. Sa phosphorylation sur la sérine 303, induite après un choc thermique, est requise afin d'augmenter la sumoylation sur la lysine qui est à proximité (lysine 298) via un recrutement plus efficace de l'enzyme E2 UBC9 (Hietakangas *et al.* 2003). Le motif conservé PDSM peut donc être considéré comme un outil utile pour prédire de nouveaux substrats de la sumoylation.

La phosphorylation peut également stimuler la sumoylation mais sans que cela se passe au niveau du motif PDSM. C'est le cas par exemple de la protéine PML qui est phosphorylée sur les résidus sérines 8, 36, 38 par la kinase HIPK2 (Gresko *et al.* 2009) induisant alors sa sumoylation sur les résidus lysine 65, 160 et 490 (Kamitani *et al.* 1998 ; Gareau et Lima, 2010).

Un motif NDSM (**N**egatively charged amino acid-**D**ependent **S**umoylation **M**otif) a également été identifié. Ce motif est une extension du motif PDSM. C'est un facteur important pour la liaison à UBC9. Le motif NDSM peut en effet créer deux contacts avec UBC9 : un entre le motif  $\psi KxE$  et le site actif d'UBC9 et un entre la queue acide de ce motif et la partie basique de la surface d'UBC9. (Yang *et al.* 2006).

Dans d'autres cas, la phosphorylation des substrats peut inhiber leur sumoylation comme cela a été décrit pour p53, IB, et les régulateurs transcriptionnels Jun, Fos, ELK1 ou encore PML (Desterro *et al.* 1998 ; Müller *et al.* 1998 ; Müller *et al.* 2000).

En effet, la phosphorylation de p53 sur la Sérine 20 réduit fortement sa sumoylation

car cela empêche son interaction avec l'enzyme de conjugaison UBC9. De façon similaire, la phosphorylation du facteur de transcription Elk1 suite à l'activation de la voie des MAPK réprime sa sumoylation. De plus l'hyperphosphorylation de PML inhibe sa sumoylation (Muller *et al.* 1998).

#### I-7-4-B) modification des enzymes impliquées dans ces deux processus

La sumoylation peut modifier les kinases FAK (**F**ocal **A**dhesion **K**inase), GSK3b (**G**lycogen **S**ynthase **K**inase **3b**), HIPK2 (**H**omeodomain-**I**nteracting **P**rotein **K**inase **2**) et ERK5 (**E**xtracellular-signal-**R**egulated **K**inase **5**).

La sumoylation de FAK augmente sa capacité à s'autophosphoryler, ce qui favorise le recrutement de plusieurs enzymes dont la famille des SRC kinases et l'activation de plusieurs voies de signalisation (Kadaré *et al.* 2003). La sumoylation du résidu K292 de GSK3b régule son activité kinase, sa localisation subcellulaire, sa stabilité ainsi que l'apoptose des cellules (Eun-Jeoung *et al.* 2008).

Lorsque HIPK2 est sumoylé, il n'interagit plus avec le corepresseur Groucho (Sung *et al.* 2005).

La sumoylation de ERK5 inhibe son activité transcriptionnelle mais pas son activité kinase (Woo *et al.* 2008).

La phosphatase PTP1B (**P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase **1B**) peut également être sumoylée. La sumoylation inhibe son activité catalytique ainsi que l'action répressive qu'elle exerce sur le récepteur à l'insuline (Dadke *et al.* 2007). Ceci montre clairement que la sumoylation peut réguler la phosphorylation à travers la modification des enzymes de la machinerie de phosphorylation.

Réciproquement, la phosphorylation régule l'activité des enzymes du processus de sumoylation. Par exemples, les SUMO E3s ligases Pc2, RanBP2, TOPORS et PIAS1 sont phosphorylées (Rosic *et al.* 2006 ; Park *et al.* 2008).

En réponse à un dommage de l'ADN, HIPK2 phosphoryle directement Pc2, ce qui active l'activité E3 ligase de Pc2 qui en retour va aller sumoyler HIPK2 (Rosic *et al.* 2006). De la même façon, la phosphorylation de TOPORS stimule son activité ubiquitine E3 ligase alors que son activité SUMO E3 ligase reste inchangée (Park *et al.* 2008).

Il est à noter également que la protéine SUMO-1 est elle-même phosphorylée. Cependant, les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation n'ont pas encore été décrites (Matic *et al.* 2008). La phosphorylation pourrait jouer un rôle important dans les interactions SUMO-SIM. Par exemple le SIM présent dans la sumo E3 ligase PIAS-1 a besoin d'être phosphorylé par la sérine/threonine kinase CK2 pour lier SUMO-1 ou SUMO2/3 (Hecker *et al.* 2006 ; Song *et al.* 2005).

Lors de mon stage EPHE, je me suis intéressée plus particulièrement à la sumoylation de deux récepteurs nucléaires : le récepteur aux oestrogènes ER $\alpha$  et le récepteur à l'acide rétinoïque RXR  $\alpha$ .

C'est pourquoi nous allons développer différentes parties sur la sumoylation des récepteurs nucléaires et plus particulièrement sur la sumoylation de ces deux récepteurs.

## II-Conséquences fonctionnelles de la sumoylation des récepteurs nucléaires ER et RXR

### II-1 La grande famille des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des protéines intracellulaires formant une large famille composée de plus de 48 membres chez l'homme, 24 d'entre eux étant des récepteurs dits ligands-dépendants (Laudet, 1997 ; Aranda et Pascual, 2001). Les ligands des récepteurs nucléaires comprennent les hormones stéroïdiennes (pour les récepteurs aux œstrogènes (ERs), le récepteur aux androgènes (AR), le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), les hormones thyroïdiennes (pour leur récepteurs TRs), l'acide rétinoïque (pour les récepteurs RARs et RXRs), la vitamine D (pour le récepteur VDR), les acides gras et les prostaglandines (qui ont pour récepteurs les PPARs). Les ligands de ces récepteurs ont une structure de petite taille qui est proche de celle des lipides de la membrane ce qui leur permet de pénétrer directement dans la cellule. Ces récepteurs nucléaires agissent en tant que facteurs de transcription ligands-dépendants. Certains récepteurs n'ont pas de ligand connu, ils sont alors appelés récepteurs orphelins. Ces derniers seraient essentiellement régulés via les modifications post-traductionnelles qu'ils subissent.

Les récepteurs nucléaires jouent un rôle majeur et ubiquitaire, intervenant dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire et participant à la régulation d'un grand nombre de fonctions (reproduction, métabolisme osseux, système cardiovasculaire et nerveux, etc.). Ils modulent l'expression des gènes. En pathologie, les récepteurs nucléaires sont aussi impliqués dans des anomalies de l'action hormonale, de la croissance tumorale, des pathologies métaboliques, etc.

#### II-1-1) Structure

Les récepteurs nucléaires présentent la même structure générale comprenant différents domaines fonctionnels notés de A à F. La région N-terminale (domaine A/B) est la plus variable en termes de taille de séquence protéique. Dans cette région, un domaine d'activation de la transcription indépendant du ligand est présent. Ce domaine est noté AF-1. Il existe une forte homologie de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) et de liaison au ligand (Ligand Binding Domain ou LBD). Le domaine de liaison à l'ADN est la région où l'homologie de séquence est la plus importante entre les différents récepteurs nucléaires. Il est composé de 66 à 68 acides aminés dont 9 résidus cystéines parfaitement conservés. Ce domaine contient 2 séquences riches en acides aminés cystéine, lysine et arginine, formant une structure en forme de doigt contenant un ion zinc. Ce motif en doigt de zinc, retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet au récepteur de se fixer sur la double hélice d'ADN au niveau des régions promotrices des gènes qu'ils régulent.

Des séquences d'acides aminés permettant la dimérisation des récepteurs, indispensables à l'activité transcriptionnelle, sont localisées dans les domaines C et E/F.

La région charnière, appelée domaine D, située entre le DBD et le LBD est variable en terme de taille et de séquence protéique. Les motifs de localisation nucléaire, appelés

motifs NLS se trouvent dans ce domaine D. Ils permettent au récepteur d'aller dans le noyau.

Les récepteurs nucléaires vont être activés grâce à la liaison du ligand au niveau du LBD qui se trouve dans le domaine E. Cette liaison du ligand va entraîner un changement de la conformation de la protéine entière, qui va soit se transloquer dans le noyau (cas du récepteur des glucocorticoïdes ou du récepteur des minéralocorticoïdes), soit échanger un corépresseur transcriptionnel pour un coactivateur transcriptionnel (c'est le cas de RAR). Le récepteur se fixera alors sur les séquences spécifiques de ses gènes cibles, et activera la transcription par l'ARN polymérase.

### II-1-2 ) Mécanismes d'action

Plusieurs types d'activation sont possibles, toutes induisent la transcription des gènes cibles hormonaux. La fixation de l'hormone induit un changement de conformation du récepteur qui rend le domaine de liaison à l'ADN accessible. Le mode de liaison à l'ADN peut se faire sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Dans certains cas, l'hétérodimérisation avec un partenaire dont le ligand est connu ou inconnu apporte une très forte augmentation de l'affinité pour le site de fixation, comme c'est le cas avec le récepteur RXR. Dans tous les cas, la liaison à l'ADN se fait sur une séquence consensus répétée appelée répétition directe (direct repeat, DR). En fonction du partenaire de dimerisation, chaque complexe ne pourra utiliser qu'un seul type de DR, en fonction de ses contraintes tridimensionnelles. Cette constatation assure la spécificité d'interaction avec l'ADN des récepteurs nucléaires.

Classiquement, la fixation d'un ligand sur son récepteur aboutit à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de l'hormone. L'interaction avec l'ADN est en effet suivie de la mise en place du complexe d'initiation de la transcription, cette mise en place étant instable, elle peut être par exemple facilitée lorsque le récepteur nucléaire interagit directement avec l'un des facteurs de ce complexe d'initiation tel que TFIID comme c'est le cas pour le couple RAR/RXR.

### II-1-3) Régulation de l'activité des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont régulés via le recrutement de complexes multiprotéiques appelés corégulateurs. Les corégulateurs peuvent être divisés en 2 principales catégories: les activateurs, que l'on appellera coactivateurs et les répresseurs que l'on nommera corépresseurs. Un même corégulateur peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription pouvant être aussi bien des récepteurs nucléaires que d'autres types de protéines nucléaires. Les coactivateurs des récepteurs nucléaires activent la transcription. De nombreux coactivateurs possèdent une activité acétyltransférase permettant de cibler les histones et de configurer ainsi l'environnement du promoteur du gène cible dans une conformation permettant la transcription de ce dernier.

Les corépresseurs exercent la fonction inverse des coactivateurs et sont en général liés aux récepteurs nucléaires en l'absence de ligand. Ils peuvent aussi être recrutés sur un récepteur nucléaire par un antagoniste du récepteur. L'activité histone déacétylase fait partie des activités biochimiques d'un grand nombre de corépresseurs. Cette activité de déacétylation antagonise les propriétés acétyltransférase des coactivateurs.

Il existe ainsi un équilibre complexe entre les coactivateurs et les corépresseurs dont la résultante régule la stimulation de l'expression des gènes par les récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires sont régulés également via leurs modifications post-traductionnelles. Leurs corégulateurs subissent eux aussi les modifications post-traductionnelles

## II-2) Sumoylation de ER et RXR : impact fonctionnel

### II-2-1) Généralités sur la sumoylation des récepteurs nucléaires et leurs cofacteurs

Il a été montré que plusieurs récepteurs nucléaires dont AR, PR (A et B) et GR, qui appartiennent, comme ER<sub>α</sub>, à la famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes, sont des substrats de la sumoylation (Poukka *et al.* 2000 ; Chauchereau *et al.* 2003 ; Tian *et al.* 2002). Ils possèdent, contrairement à ER<sub>α</sub> comme nous le verrons plus tard, des sites consensus de sumoylation (KxE). De plus, leur sumoylation est hormono-dépendante et conduit à une diminution de leur activité transcriptionnelle.

Certains co-facteurs de ces récepteurs nucléaires sont eux aussi sumoylés. C'est le cas par exemple de deux co-activateurs de la famille SRC : SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) et GRIP-1 (Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein-1), tous deux sumoylés sur des lysines présentes dans leurs domaines d'interactions avec les récepteurs nucléaires (Chauchereau *et al.* 2003 ; Kotaja *et al.* 2002). D'une manière générale, leur sumoylation entraîne une stimulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Concernant GRIP-1, un changement dans sa localisation cellulaire a en plus été décrit : lorsqu'il ne peut plus être sumoylé, GRIP1 perd sa capacité à être colocalisé avec le récepteur des androgènes (AR) dans le noyau.

Dans mon projet, je me suis intéressée plus particulièrement à deux récepteurs nucléaires : ER<sub>α</sub> et RXR<sub>α</sub>.

### II-2-2) Sumoylation de ER

#### II-2-2-A) Généralités

Les œstrogènes interagissent avec leurs récepteurs spécifiques ERs (Estrogen Receptor) exprimés au niveau de nombreux tissus cibles. Ces récepteurs sont codés par deux gènes distincts chez l'animal possédant les deux types de récepteurs : il s'agit des récepteurs ER<sub>α</sub> et ER<sub>β</sub>.

Le récepteur ER<sub>α</sub> est impliqué dans le contrôle positif de la prolifération cellulaire. Il est exprimé principalement dans les organes reproducteurs. Il est l'isoforme dominante des glandes mammaires. (Klinge, 2000 ; Song *et al.* 2005). Le récepteur ER<sub>β</sub> est exprimé dans de nombreux tissus en complément ou en absence d'ER<sub>α</sub>.

De nombreux arguments épidémiologiques (environ 95% des cancers du sein sont hormono-dépendants) et cliniques, ainsi que la mise en place de modèles cellulaires et animaux, démontrent clairement une implication des œstrogènes (en dehors de leurs fonctions physiologiques) à la fois dans la prolifération des carcinomes mammaires avérés, mais également dans la carcinogénèse mammaire via leur liaison à leur récepteur: ER<sub>α</sub> (Pasqualini, 2004). ER<sub>α</sub> est exprimé dans environ 70% des cancers du sein (Khan *et*

*al.*,1998). La présence de cette isoforme est associée à un meilleur pronostic en vue du traitement hormonal puisque 50% des tumeurs ER $\alpha$  positives répondent aux thérapies anti-oestrogéniques (Shao et Brown, 2004). Les tumeurs ER $\alpha$  négatives sont plus invasives et métastatiques. Quand au rôle de ER $\beta$ , il s'avère encore très controversé. En effet, de nombreuses études suggèrent plutôt des propriétés antitumorales de cette isoforme : les tumeurs ER $\beta$ + sont bien différenciées, moins agressives et prolifèrent plus lentement (Jarvinen *et al.* 2000).

Nous nous sommes intéressés à la régulation de ER $\alpha$  à travers l'étude de son interaction avec les partenaires protéiques ainsi que de ses modifications post-traductionnelles.

### II-2-2-B) Régulation de l'activité du récepteur ER $\alpha$ via son interaction avec des partenaires protéiques

Dans la cellule, il existe plusieurs voies de signalisation de ER $\alpha$  : une voie dite génomique où ER $\alpha$ , après sa liaison aux œstrogènes, se dimérise et régule la transcription des gènes cibles soit directement en se fixant sur ses éléments de réponse (appelés ERE pour **E**strogen **R**esponsive **E**lement), soit indirectement en interagissant avec des facteurs de transcription comme AP-1 et SP-1 (Kushner *et al.* 2000). Une fois recruté sur les régions promotrices de ses gènes cibles, ER s'associe à des corégulateurs qui sont des complexes multiprotéiques. Ils peuvent être des activateurs ou des répresseurs de son activité transcriptionnelle. Ensuite le recrutement des corégulateurs permettra l'initiation de la transcription des gènes cibles de ER $\alpha$ .

Il existe également une voie d'activation de ER $\alpha$  appelée voie non génomique : les œstrogènes induisent alors une réponse cellulaire très rapide qui met en jeu un pool de molécules ER $\alpha$  localisées près de la membrane plasmique (Bjornstrom *et al.* 2005). Le complexe ER $\alpha$ /E<sub>2</sub> interagit avec la protéine tyrosine kinase Src, la sous-unité p85 de la PI3K et d'autres protéines accessoires, formant ainsi un macrocomplexe qui entraîne l'activation de cascades de signalisation, dont celle des voies MAPK et AKT. Ces voies de signalisation régulent la prolifération cellulaire, notamment par l'activation de la transcription de gènes comme celui de la cycline D1.

Récemment l'équipe du Dr Laura Corbo a montré que la méthylation de ER par l'arginine méthyl transférase PRMT1 (proteïn arginine N-méthyltransferase) joue un rôle clef dans l'activation des voies non génomiques induite par les œstrogènes. En effet cette modification est essentielle à la formation du macrocomplexe qui contient ER $\alpha$ /Src/PI3K/FAK (Le Romancer *et al.* 2008).

La fonction et la stabilité du récepteur et de ses co-régulateurs peuvent également être modulées par différents processus de modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination ou plus récemment la sumoylation, ce qui ajoute un autre niveau de régulation (Poulard *et al.* 2010).

### II-2-2-C) Régulation de l'activité du récepteur ER $\alpha$ via les modifications post-traductionnelles

Le récepteur aux œstrogènes est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles. Toutes ces modifications coordonnent la signalisation inter- et intra-

moléculaire afin de contrôler de manière qualitative et quantitative les fonctions de la protéine.

Un grand nombre de tumeurs mammaires résistantes à l'action des anti-estrogènes sont caractérisées par des aberrations de l'activité et/ou de l'expression de complexes enzymatiques (kinases, acétylases, méthylases, désomoylases...). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux modifications post-traductionnelles de ER $\alpha$ .

Le récepteur aux œstrogènes comporte de nombreux résidus phosphorylés. En effet, les sérines 104, 106, 118, 167, 236 et 305 ont été identifiées comme étant des sites de phosphorylation. La phosphorylation des sérines 104/106 est induite par les kinases GSK3 et CDK2 et plus récemment par la voie des MAPK, ce qui active la transcription (Thomas *et al.* 2008 ; Medunjanin *et al.* 2005 ; Rogatsky *et al.* 1999 ; Le romancer *et al.* 2011). La phosphorylation sur la sérine 118 induite, quant à elle par IKK $\alpha$  (Weitsman GE *et al.* 2006), est importante pour la dimérisation de ER $\alpha$ , mais également pour l'activation et la répression de plusieurs gènes cibles de ER $\alpha$ . La phosphorylation de cette sérine facilite la liaison de ER $\alpha$  avec ses coactivateurs tels que CBP/p300 (Dutertre et Smith, 2003) et Src (Shah et Rowan, 2005), ce qui active le récepteur. La sérine 167 est phosphorylée par la kinase S6K1, ce qui régule l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . La phosphorylation de la sérine 236 par PKA participe à la dimérisation de ER $\alpha$  et protège le récepteur de la dégradation (Tsai *et al.* 2004). Des études ont montré que, *in vitro*, la sérine 305 était phosphorylée par PKA. La phosphorylation sur cette sérine régule également l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes, mais elle joue également un rôle dans l'interaction entre ER $\alpha$  et ses coactivateurs tels que SRC1 (Michalides *et al.* 2004). Les résidus tyrosine 537 et thréonine 311 ont également été identifiés comme des sites phosphorylés (Arnold *et al.* 1997). Leur phosphorylation régule respectivement la fixation de E<sub>2</sub> sur ER $\alpha$  et inhibe l'export nucléaire du récepteur. (Arnold *et al.* 1997 ; Lee et Bai, 2002).

Le récepteur est également ubiquitiné, ce qui permet de réguler sa stabilité via sa dégradation. En effet les lysines 302 et 303 ont été identifiées comme des cibles de polyubiquitinylation, ce qui joue un rôle d'activateur de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . (Reid *et al.* 2002 ; Berry *et al.* 2008).

Le récepteur aux œstrogènes est également acétylé sur les résidus lysines 266, 268, 299, 302 et 303 (Kim *et al.* 2006 ; Wang *et al.* 2001). L'acétylation de ER $\alpha$  sur les résidus lysines 299, 302 et 303 réprime son activité transcriptionnelle, cependant l'acétylation sur les lysines 266 et 268 stimule la liaison du récepteur à l'ADN et par conséquent son activité transcriptionnelle.

Enfin, il est également palmitoylé sur la cystéine 447 ce qui permet la localisation membranaire d'une fraction de ER $\alpha$  (Acconica *et al.* 2008).

Récemment des études ont montré que le récepteur aux œstrogènes pouvait aussi être méthylé sur la lysine 302, ce qui régule la réponse transcriptionnelle induite par les œstrogènes (Subramanian *et al.* 2008). Comme ce résidu lysine est également ubiquitiné, sa méthylation le protège de l'ubiquitination et donc stabilise le récepteur. Notre équipe a également montré que le récepteur était méthylé sur l'arginine 260 ce qui permet la formation du macrocomplexe ER $\alpha$ /Src/PI3K/FAK et régule l'activité non génomique du récepteur (Le Romancer *et al.* 2008).

Une étude menée par le docteur Stéphanie Sentis a montré que le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  est sumoylé par les SUMO-E3 ligases PIAS1 et PIAS3 de manière

ligand dépendante, puisque l'oestradiol et le tamoxifène induisent tous deux l'apparition de formes sumoylées du récepteur (Sentis *et al.* 2005). ER<sub>α</sub> ne possédant pas de site consensus, elle a ensuite déterminé les lysines cibles de cette modification. Pour cela divers mutants de ER<sub>α</sub> ont été construits. L'équipe a démontré que le récepteur était sumoylé au niveau des résidus lysines 266, 268, 299, 302, et 303 situés dans la région charnière de ER<sub>α</sub>. Elle a également démontré que cette modification jouait un rôle clef sur son activité transcriptionnelle car les mutants qui présentent des défauts dans leur état de sumoylation sont transcriptionnellement moins actifs que la protéine sauvage.

#### II-2-2-D) Cross-talk entre les modifications post-traductionnelles de ER<sub>α</sub>

Les différentes modifications post-traductionnelles peuvent interférer pour réguler l'activité transcriptionnelle de ER<sub>α</sub> (Le Romancer *et al.* 2011).

De manière intéressante, il a été montré qu'acétylation et phosphorylation pouvaient être des processus antagonistes. En effet, lorsque la sérine 305 est mutée en acide glutamique, mimant ainsi une phosphorylation constitutive, cela conduit à une augmentation de la phosphorylation de la sérine 118 et à une inhibition de l'acétylation de la lysine 303. La phosphorylation de la sérine 305 par PAK1, est donc nécessaire au maintien de la phosphorylation de la sérine 118 et à l'inhibition de l'acétylation de la lysine 303, ce qui a pour effet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de ER<sub>α</sub> (Cui *et al.* 2004). La phosphorylation des sérines 118 et 167 favorisent l'acétylation de ER<sub>α</sub> (Ma *et al.* 2010).

De plus, récemment il a été décrit que l'acétylation de la lysine 303 empêche la méthylation de ER<sub>α</sub> sur la lysine 302, ce qui le rend donc instable. Ceci participerait à l'effet négatif de l'acétylation de la lysine 303 sur la transcription. (Subramanian *et al.* 2004).

La lysine 302 du récepteur subit deux modifications post-traductionnelles: la méthylation et l'ubiquitination. La méthylation est donc directement en compétition avec l'ubiquitination.

#### II-2-3) Les récepteurs aux rétinoïdes

##### II-2-3-A) Généralités

Les rétinoïdes jouent des rôles importants dans la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Parisotto *et al.* 2006). Les voies métaboliques de synthèse et d'inactivation de l'acide rétinoïque sont affectées lors de la tumorigenèse. L'acide rétinoïque (AR) est synthétisé dans les tissus par deux étapes successives d'oxydation à partir du rétinol (vitamine A). Deux isomères de l'AR, les formes tout-trans et 9-cis sont des ligands de deux familles distinctes de récepteurs nucléaires, les RAR (**R**etinoic **A**cid **R**eceptor) qui interagissent avec les deux formes d'AR, et les RXR (**R**etinoid **X** **R**eceptor) qui s'associent spécifiquement à l'AR 9-Cis (9cRA).

Les récepteurs aux rétinoïdes sont impliqués dans le développement de l'organisme et dans l'homéostasie cellulaire. Des altérations de leurs expressions ont été observées dans différents types de cancers dont les tumeurs bronchiques, ou encore le cancer de la prostate (Miller, 1998). Dans les leucémies promyélocyaires aiguës, une translocation (t15, t17) impliquant le récepteur à l'acide rétinoïque est généralement retrouvée dans les cellules leucémiques. En effet cette maladie est liée à l'expression du gène de fusion PML/RAR. L'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement des patients permet d'augmenter significativement le pourcentage des rémissions.

Mon projet s'est porté sur le récepteur RXR, nous nous concentrerons donc sur celui-ci.

Le récepteur RXR comporte 3 isoformes codées par 3 gènes différents :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ce récepteur agit comme un facteur de transcription, s'associant sous forme d'homodimères de RXR ou d'hétérodimères (notamment avec RAR) à des séquences spécifiques d'ADN qui sont composées de motifs répétés séparés par 1, 2 ou 5 paires de bases.

De plus RXR $\alpha$  est un composant essentiel de la protéine de fusion PML/RAR $\alpha$ . Cette protéine de fusion est un puissant répresseur transcriptionnel qui interfère avec l'expression des gènes impliqués dans le renouvellement et la différenciation des cellules myéloïdes. La présence de RXR dans le complexe PML/RAR, non seulement facilite la liaison à l'ADN, mais est également nécessaire pour la différenciation due à l'induction des rétinoïdes ce qui démontre que RXR n'est pas un partenaire silencieux, mais un facteur déterminant de la transformation (Zhu *et al.* 2005).

### II-2-3-B) Régulation de l'activité du récepteur RXR $\alpha$ via son interaction avec les partenaires protéiques

Comme nous venons de le voir, RXR peut former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires, dont certains (PPAR, FXR, LXR, Nurr1) sont permissifs pour une réponse transcriptionnelle à l'AR 9-cis.

En l'absence du ligand, les récepteurs aux rétinoïdes sont liés à des répresseurs transcriptionnels tels que N-CoR (une histone désacétylase, HDAC) : la chromatine est donc très compactée, la transcription ne peut donc pas avoir lieu (Bastien et Rochette Ehly, 2003).

Lorsque le ligand est présent, les répresseurs se dissocient des récepteurs, ce qui permet le recrutement des coactivateurs qui sont associés à des histones acétyltransférase (HAT) et des kinases, ce qui permet à la chromatine de se décompacter. Il y a ensuite le recrutement du médiateur qui accélère l'entrée de l'ARN Pol II et les facteurs généraux de la transcription sont également recrutés ce qui engendre l'initiation de la transcription.

### II-2-2-C) Régulation de l'activité du récepteur RXR $\alpha$ via sa phosphorylation

Le récepteur à l'acide rétinoïque de souris mRXR a été montré comme étant constitutivement phosphorylé (Adam-Stitah S *et al.* 1999). En effet, certains signaux de stress tels que les radiations UV et l'arsenite trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) activent la voie JNK qui hyperphosphoryle RXR $\alpha$  (Bruck *et al.* 2005).

Les radiations UV activent les kinases JNK1, JNK2 qui phosphorylent RXR $\alpha$  sur les sérines 61, 75 et la thréonine 87, toutes situées dans la région AF-1 (région NH<sub>2</sub>-terminal B) et la sérine 265 située quant à elle dans la région LBD (la région E).

L'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induit également la phosphorylation du domaine N-terminal de RXR $\alpha$  sur les sites T87 et S265. Il induit l'activation de Erks, p38, MAPK et JNKs (Tarrade *et al.* 2005).

Cependant la phosphorylation de la serine 265 du récepteur qui se produit en réponse à l'anisomycine inhibe l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de l'acide rétinoïque (Bruck *et al.* 2005). L'acide rétinoïque quant à lui induit la phosphorylation du domaine N-terminal de RXR $\alpha$ , ce processus joue un rôle positif sur l'activité transcriptionnelle des

gènes cibles par l'hétérodimère RAR/RXR $\alpha$  (Bruck *et al.* 2005).

#### II-2-2-D) Régulation de RXR par le processus de sumoylation

Une seule étude de 2006 a montré que RXR humain était modifié de façon covalente par SUMO1 *in vivo* tout comme *in vitro* (Choi *et al.* 2006). Cette étude a montré en premier lieu que RXR $\alpha$  interagissait avec l'enzyme E2 UBC9 de la sumoylation.

RXR $\alpha$  contient deux séquences similaires à la séquence consensus \_KXE dans la région Hinge et le domaine LBD. Cependant il a été montré que les lysines présentes dans ces deux séquences (respectivement la lysine 201 et la lysine 245) ne sont pas des sites accepteurs de SUMO1. Des résidus lysines situés en dehors des séquences consensus ont été montrés comme étant des sites de sumoylation, ce qui est le cas pour RXR $\alpha$ . En effet, grâce à différents mutants mutés sur des lysines situées dans un site non consensus, la lysine 108 a été identifiée comme étant le site majeur de sumoylation de RXR $\alpha$  *in vivo* et *in vitro*. La sumoylation de RXR $\alpha$  par SUMO1 inhibe son activité transcriptionnelle. Lorsque RXR $\alpha$  est en homodimère et qu'il est muté sur la lysine 108, son activité transcriptionnelle est augmentée, ce qui montre bien que la sumoylation inhibe son activité transcriptionnelle. De plus lorsque RXR $\alpha$  est en hétérodimère avec RAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , et qu'il est également muté sur cette même lysine, des résultats similaires sont obtenus (Choi *et al.* 2006). Des études récentes ont montré que des modifications post-traductionnelles spécifiques de PML/RAR $\alpha$  telles que la sumoylation étaient essentielles pour la transformation cellulaire (Zhu *et al.* 2005). Le complexe PML/RAR favorise la sumoylation de RXR $\alpha$  par SUMO1, ce qui induit la répression transcriptionnelle de RXR $\alpha$ . Les domaines impliqués dans la sumoylation de PML/RAR jouent un rôle clef dans l'hypersumoylation de RXR $\alpha$  (Zhu *et al.* 2005).

Dans une autre étude (Choi *et al.* 2006), l'interaction entre RXR et SENP6 a été identifiée par double hybride chez la levure. Cette interaction est indépendante de l'état de sumoylation de RXR $\alpha$  puisqu'elle est identique que l'on utilise la protéine RXR sauvage ou son mutant qui n'est plus sumoylable. De plus SENP6 désumoyle RXR $\alpha$  ce qui augmente son activité transcriptionnelle. Ceci confirme bien que la sumoylation inhibe son activité transcriptionnelle. En outre, RXR $\alpha$  est une cible spécifique pour SENP6 car SENP1 montre une activité relativement faible envers RXR $\alpha$ . Enfin SENP6 agit spécifiquement sur RXR $\alpha$ , car elle ne désumoyle pas deux autres récepteurs nucléaires qui sont AR et PPAR  $\gamma$ .

# Bibliographie

## **Bibliographie**

**Adam-Stitah S, Penna L, Chambon P, Rochette-Egly C.** (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem.* 2;274(27):18932-41.

**Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M.** (2004). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell.* 2005 Jan;16(1):231-7.

**Alkuraya FS, Saadi I, Lund JJ, Turbe-Doan A, Morton CC, Maas RL.**(2006). SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science.* 22;313(5794):1751.

**Aranda A, Pascual A.** (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.*;81(3):1269-304

**Arnold SF, Melamed M, Vorobjikina DP, Notides AC, Sasson S.** (1997). Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* ; 11 : 48-53.

**Bailey D, O'Hare P.** (2004). Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. *J Biol Chem.* 2;279(1):692-703.

**Bastien J, Rochette-Egly C.**(2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004 Mar 17;328:1-16.

**Bawa-Khalife T, Cheng J, Wang Z, and Yeh ET.** (2007). Induction of the SUMO-specific protease 1 transcription by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 282: 37341

**Bawa-Khalife T, Yeh ET.** (2010). SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. *Genes Cancer.* 2010 Jul;1(7):748-752.

**Berry NB, Fan M, Nephew KP.** (2004). Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol.* 2008 Jul;22(7):1535-51. Epub 2008 Apr 3. *Biol Chem* 2004, 279:36440-36444.

**Best J.L, Ganiatsas. S, Agarwal.S, Changou.A, Salomoni.P, Shirihai.O, Meluh.P.B, Pandolfi. PP, Zon.L.I,** SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML, *Mol. Cell* 10 (2002) 843–855

**Björnström L, Sjöberg M.**(2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.*;19(4):833-42.

**Boggio R, Chiocca S.** (2006). Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr Opin Microbiol.* ;9(4):430-6.

**Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S.** (2004). A mechanism for inhibiting the SUMO pathway *Mol Cell.* 19;16(4):549-61.

**Boggio R, Passafaro A, Chiocca S.** (2007). Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J Biol Chem.*;282(21):15376-82.

**Bossis G, Melchior F.** (2006). Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell.* 3;21(3):349-57.

**Bossis G, Melchior F.**(2006). SUMO: regulating the regulator. *Cell Div.* 29;1:13.

**Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, Pestell RG.** (2005). SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem.* 18;280(11):10264-76.

**Braschi E, Zunino R, McBride HM.** (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep.* 2009 Jul;10(7):748-54. Epub 2009 May 1.

- Bruck N, Bastien J, Bour G, Tarrade A, Plassat JL, Bauer A, Adam-Stitah S, Rochette-Egly C.** (2005). Phosphorylation of the retinoid x receptor at the omega loop, modulates the expression of retinoic-acid-target genes with a promoter context specificity. *Cell Signal.*;17(10):1229-39.
- Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, Bouchot A, Landry J, Piechaczyk M, Garrido C.** (2009) Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene.* 17;28(37):3332-44. 13.
- Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z.** (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell.*;101(7):753-62.
- Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E.** (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia *Cell.* 19;131(2):309-23.
- Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH.** (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol.*;9(4):428-35.
- Castro CP, Giacomini D, Nagashima AC, Onofri C, Graciarena M, Kobayashi K, Páez-Pereda M, Renner U, Stalla GK, Arzt E.** (2003). Reduced expression of the cytokine transducer gp130 inhibits hormone secretion, cell growth, and tumor development of pituitary lactosomatotrophic GH3 cells. *Endocrinology.*;144(2):693-700.
- Chang CC, Naik MT, Huang YS, Jeng JC, Liao PH, Kuo HY, Ho CC, Hsieh YL, Lin CH, Huang NJ, Naik NM, Kung CC, Lin SY, Chen RH, Chang KS, Huang TH, Shih HM.**(2011). Structural and Functional Roles of Daxx SIM Phosphorylation in SUMO Paralog-Selective Binding and Apoptosis Modulation. *Mol Cell.* 8;42(1):62-74.
- Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E.** (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem.* 4;278(14):12335-43.
- Cheng J, Bawa T, Lee P, Gong L, and Yeh ET.** (2006). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8: 667–676.
- Cheng J, Kang X, Zhang S, and Yeh ET.** (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* 131: 584–595.
- Cheng J, Wang D, Wang Z, and Yeh ET.** (2004) SENP1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol* 24: 6021–6028.
- Chiu SY, Asai N, Costantini F, Hsu W.** (2008). SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol.* 16;6(12):e310.
- Choi SJ, Chung SS, Rho EJ, Lee HW, Lee MH, Choi HS, Seol JH, Baek SH, Bang OS, Chung CH.** (2006). Negative modulation of RXRalpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1. *J Biol Chem.* 13;281(41):30669-77.
- Comerford KM, Leonard MO, Karhausen J, Carey R, Colgan SP, Taylor CT.** (2003). Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(3):986-91.
- Cui Y, Zhang M, Pestell R, Curran EM, Welshons WV, Fuqua SA.** (2004). Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res.* 15;64(24):9199-208.
- Culver C, Melvin A, Mudie S, Rocha S.** (2011). HIF-1<sub>α</sub> depletion results in SP1-mediated cell cycle disruption and alters the cellular response *Cell Cycle.*;10(8):1249-60.
- Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, Rauscher F 3rd, Shuai K, Ng T, Neel BG,**

- Chernoff J.** (2007). Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol.*;9(1):80-5.
- David G, Neptune MA, DePinho RA.** (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem.* 28;277(26):23658-63.
- Demarque MD, Nacerddine K, Neyret-Kahn H, Andrieux A, Danenberg E, Jouvion G, Bomme P, Hamard G, Romagnolo B, Terris B, Cumano A, Barker N, Clevers H, Dejean A.** (2011). Sumoylation by Ubc9 regulates the stem cell compartment and structure and function of the intestinal epithelium in mice. *Gastroenterology.* ;140(1):286-96.
- Denison C, Rudner AD, Gerber SA, Bakalarski CE, Moazed D, Gygi SP.** (2005). A proteomic strategy for gaining insights into protein sumoylation in yeast. *Mol Cell Proteomics.* ;4(3):246-54.
- Denuc A, Bosch-Comas A, González-Duarte R, Marfany G.** (2009). The UBA-UIM domains of the USP25 regulate the enzyme ubiquitination state and modulate substrate recognition. *PLoS One.* ;4
- Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, and R. T. Hay.** (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF $\kappa$ B activation. *Mol. Cell.* 2:233–239.
- Deyrieux AF, Rosas-Acosta G, Ozbun MA, Wilson VG.** (2007). Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *J Cell Sci.* 1;120(Pt 1):125-36.
- Di Bacco A, Gill G.** (2006). SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation. *Cell Cycle.*;5(20):2310-3.
- Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H, Gill G.** (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol.*;26(12):4489-98.
- Dohmen RJ, Stappen R, McGrath JP, Forrová H, Kolarov J, Goffeau A, Varshavsky A.** (1995). An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):18099-109.
- Drag Marcin and Salvesen Guy S.** (2008). DeSUMOylating Enzymes—SENPs *Life*, 60(11): 734–742, November 2008
- Dutertre M, Smith CL.** (2003) Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol.* 2003 Jul;17(7):1296-314.
- Eun Jeoung L, Sung Hee H, Jaesun C, Sung Hwa S, Kwang Hum Y, Min Kyoung K, Tae Yoon P, Sang Sun K.** (2008). Regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  functions by modification of the small ubiquitin-like modifier. *Open Biochem J.* 2008;2:67-76.
- Evdokimov, E., Sharma, P., Lockett, S. J., Lualdi, M. and Kuehn, M. R.** (2008) Loss of SUMO1 in mice affects RanGAP1 localization and formation of PML nuclear bodies, but is not lethal as it can be compensated by SUMO2 or SUMO3. *J Cell Sci.* 15;121(Pt 24):4106-13.
- Flick K, Kaiser P.** (2009). Proteomic revelation: SUMO changes partners when the heat is on. *Sci Signal.* 28;2(81):pe45.
- Gao C, Ho CC, Reineke E, Lam M, Cheng X, Stanya KJ, Liu Y, Chakraborty S, Shih HM, Kao HY.** (2008). Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(18):5658-67.
- Gareau JR, Lima CD.**(2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* ;11(12):861-71.
- Geiss-Friedlander R, Melchior F.** (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

;8(12):947-56.

**Gius D, Botero A, Shah S, Curry HA.** (1999). Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicol Lett.* 1;106(2-3):93-106.

**Golebiowski F, Matic I, Tatham MH, Cole C, Yin Y, Nakamura A, Cox J, Barton GJ, Mann M, Hay RT.** (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal.* 26;2(72):ra24.

**Gong L and Yeh EH.** (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281: 15869–15877.

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

**Grégoire S, Yang XJ.** (2005) Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors *Mol Cell Biol.*25(6):2273-87.

**Gresko E, Ritterhoff S, Sevilla-Perez J, Roscic A, Fröbuis K, Kotevic I, Vichalkovski A, Hess D, Hemmings BA, Schmitz ML.** (2009). PML tumor suppressor is regulated by HIPK2-mediated phosphorylation in response to DNA damage. *Oncogene* 28, 698–708 .

**Haindl M, Harasim T, Eick D, Muller S.** (2008). The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep.* 2008 Mar;9(3):273-9 .

**Hang J, Dasso M.** (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19961-6.

**Hannich JT, Lewis A, Kroetz MB, Li SJ, Heide H, Emili A, Hochstrasser M.** (2005). Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 11;280(6):4102-10.

**Harder Z, Zunino R, McBride H.** (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol.* 2004 Feb 17;14(4):340-5.

**Hattersley N, Shen L, Jaffray EG, Hay RT.** (2011). The SUMO protease SENP6 is a direct regulator of PML nuclear bodies. *Mol Biol Cell.* 1;22(1):78-90.

**Hay RT.** (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 1;18(1):1-12 .

**Hayashi T, Seki M, Maeda D, Wang W, Kawabe Y, Seki T, Saitoh H, Fukagawa T, Yagi H, Enomoto T.** (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp Cell Res.* 1;280(2):212-21.

**Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I** (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281: 16117–16127

**Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, Sistonen L.** (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 3;103(1):45-50. Epub 2005 Dec 21.

**Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, Mikhailov A, Palvimo JJ, Pirkkala L, 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(8):2953-68.

**Huang C, Han Y, Wang Y, Sun X, Yan S, Yeh ET, Chen Y, Cang H, Li H, Shi G, Cheng J, Tang X, Yi J.** (2009). SENP3 is responsible for HIF-1 transactivation under mild oxidative stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J.* 2009 Sep 16;28(18):2748-62.

**Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF.** (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;95(14):7987-92.

**Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S.** (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.*

26;115(5):565-76.

**Hurley JH, Lee S, Prag G.** (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J.* 2006 Nov 1;399(3):361-72.

**Itahana Y, Yeh ET, and Zhang Y.** (2006). Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2. *Mol Cell Biol* 26:4675–4689, 2006.

**Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr.** (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*.20;292(5516):464-8.

**Järvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J.** (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ER $\alpha$  and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol.* ;156(1):29-35.

**Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ, Blobel G.** (1997). The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* 15;16(18):5509-19.

**Jones D, Crowe E, Stevens TA, Candido EP.** (2002). Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* ;3(1):RESEARCH0002.

**Kadaré G, Toutant M, Formstecher E, Corvol JC, Carnaud M, Bouterin MC, Girault JA.** (2003). PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem.* 28;278(48):47434-40.

**Kagey MH, Melhuish TA, Wotton D.** (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell.* 4;113(1):127-37.

**Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET.** (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J. Biol. Chem.* 273, 26675–26682.

**Kang X, Qi Y, Zuo Y, Wang Q, Zou Y, Schwartz RJ, Cheng J, Yeh ET.** (2010) SUMO-specific protease 2 is essential for suppression of polycomb group protein-mediated gene silencing during embryonic development. *Mol Cell.*;38(2):191-201.

**Khan SA, Rogers MA, Khurana KK, Meguid MM, Numann PJ.** (1998). Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 7;90(1):37-42.

**Kerscher O.** (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.*;8(6):550-5.

**Kim, K. I. Baek SH, Jeon YJ, Nishimori S, Suzuki T, Uchida S, Shimbara N, Saitoh H, Tanaka K, Chung CH.** (2000). A new SUMO<sub>1</sub>-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J. Biol. Chem.* 275, 14102–14106

**Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL.** (2006). Acetylation of estrogen receptor  $\alpha$  by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol.* 2006 Jul;20(7):1479-93.

**Kim YH, Sung KS, Lee SJ, Kim YO, Choi CY, Kim Y.** (2005). Desumoylation of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) through the cytoplasmic-nuclear shuttling of the SUMO-specific protease SENP1. *FEBS Lett* 579: 6272–6278.

**Kirsh O, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Müller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, Dejean A.** *EMBO J.* (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. ;21(11):2682-91.

**Klinge CM.** (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids.*;65(5):227-51.

**Kotaja N, Karvonen U, Jänne OA, Palvimo JJ.** (2002). The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem.* 16;277(33):30283-8.

**Kushner PJ, Agard D, Feng WJ, Lopez G, Schiau A, Uht R, Webb P, Greene G.** (2000). Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements. *Novartis Found Symp.*;230:20-6; discussion 27-40

**Kuo HY, Chang CC, Jeng JC, Hu HM, Lin DY, Maul GG, Kwok RP, Shih HM.** (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc. Natl Acad.Sci. USA* 102, 16973–16978.

**Kuo ML, den Besten W, Thomas MC, Sherr CJ.** (2008). Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle.* 2008 Nov 1;7(21):3378-87.

**Lallemant-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de Thé H.** (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol.*;10(5):547-55.

**Laudet V** (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19:207–226.

**Le Romancer Muriel, Poulard Coralie, Cohen Pascale, Sentis Stéphanie.** (2011). Cracking the Estrogen Receptor's Post translational Code of in Breast Tumors.

**Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo.** (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell.* 25;31(2):212-21.

**Ledl A, Schmidt D, Müller S.** (2005) Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene.* ;24(23):3810-8.

**Lee JH, Park SM, Kim OS, Lee CS, Woo JH, Park SJ, Joe EH, Jou I.** (2009). Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRBeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol Cell.* 24; ;35(6):806-17.

**Lee JS, Thorgeirsson SS.** (2004). Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets. *Gastroenterology.*;127(5 Suppl 1):S51-5.

**Lee H, Bai W.** (2002). Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* ; 22 : 5835-45.

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

**Li X, Luo Y, Yu L, Lin Y, Luo D, Zhang H, He Y, Kim YO, Kim Y, Tang S, and Min W.** (2008). SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 15:

**Lima CD and Reverter D.** (2008). Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7. *J Biol Chem* 283: 32045–32055.

**Liu B, Shuai K.** (2008). Regulation of the sumoylation system in gene expression. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):288-93.

**Ma Y, Fan S, Hu C, Meng Q, Fuqua SA, Pestell RG, Tomita YA, Rosen EM.** (2010). BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol.*;24(1):76-90

**Mabb AM, Wuerzberger-Davis SM, Miyamoto S.** (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-

kappaB activation in response to genotoxic stress *Nat Cell Biol.*;8(9):986-93.

**Manza LL, Codreanu SG, Stamer SL, Smith DL, Wells KS, Roberts RL, Liebler DC.** (2004). Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* ;17(12):1706-15.

**Martin N, Schwamborn K, Schreiber V, Werner A, Guillier C, Zhang XD, Bischof O, Seeler JS, Dejean A.** (2009). PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J.* 18;28(22):3534-48.

**Matic I, Macek B, Hilger M, Walther TC, Mann M.** (2008). Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution. *J Proteome Res.* 2008 Sep;7(9):4050-7.

**McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M.** (2002). Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2002 Apr;8(4):1127-38.

**Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D.** (2005) Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):33006-14.

**Meek DW, Knippschild U.** (2003). Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res.*;1(14):1017-26.

**Meulmeester E, Kunze M, Hsiao HH, Urlaub H, Melchior F.**(2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell.* 6;30(5):610-9.

**Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, Floore A, Velds A, van't Veer L, Neeffjes J.** (2004). Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell.*;5(6):597-605.

**Miller WH Jr.** (1998). The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer.* 15;83(8):1471-82.

**Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D.** (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):36316-23.

**Miteva Maria, Keusekotten Kirstin Hofmann, Kay, Gerrit J.K. Praefcke, and R. Dohmen Jürgen.** (2010). Sumoylation as a Signal for Polyubiquitylation and Proteasomal Degradation 2010 Landes Bioscience and Springer Science.

**Mo YY, Yu Y, Theodosiou E, Ee PL, Beck WT.**(2005). A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene*;24(16):2677-83.

**Mooney SM, Grande JP, Salisbury JL, Janknecht R.** (2010). Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* 12; 49(1):1-10. [PubMed:19995069]

**Morimoto RI.** (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging *Genes Dev.* 2008 Jun 1;22(11):1427-38.

**Morimoto RI.** (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 1998 Dec 15;12(24):3788-96.

**Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T. and Ishii, S.** (2005) TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell.* 2005 Nov;16(11):5433-44.

**Mukhopadhyay D, Arnautov A, Dasso M.** (2010). The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *J Cell Biol.* 8;188(5):681-92.

**Mukhopadhyay D, Ayaydin F, Kolli N, Tan SH, Anan T, Kametaka A, Azuma Y, Wilkinson KD, Dasso**

- M.** (2006).SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol.* 25;174(7):939-49.
- Mukhopadhyay D, Dasso M.** (2010).The fate of metaphase kinetochores is weighed in the balance of SUMOylation during S phase. *Cell Cycle.* 2010 Aug 15;9(16):3194-201.
- Muller, S., Berger M, Lehembre. M, Seeler J.S, Haupt.S, and Dejean.A.** (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol.Chem.* 275:13321–13329
- Müller S, Dejean A.** (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol.*;73(6):5137-43.
- Muller, S., M. J. Matunis, and A. Dejean.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 2;17(1):61-70.
- Nacerddine K, Lehembre F, Bhaumik M, Artus J, Cohen-Tannoudji M, Babinet C, Pandolfi PP, Dejean A.**(2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell.* ;9(6):769-79.
- Nishida.T, Kaneko.F, Kitagawa.M, Yasuda. H,** (2001). Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation, *J. Biol.Chem.* 276 (2001) 39060–39066.
- Nishida T, Tanaka H, and Yasuda H.** (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267: 6423–6427. nucleus.
- Nishida T, Yasuda H.** (2002). PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41311-7.
- Oh SM, Liu Z, Okada M, Jang SW, Liu X, Chan CB, Luo H, Ye K.** (2010). Ebp1 sumoylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity. *Oncogene.* 18;29(7):1017-30.
- Parisotto M, Brodeur H, Bhat PV, Mader S .** (2006).Retinoid metabolism and cancer. *Med Sci (Paris).* ;22(12):1101-6.
- Park HJ, Zheng H, Kulkarni D, Kerrigan J, Pungaliya P, Saleem A, Rubin EH.** (2008). Identification of phosphorylation sites of TOPORS and a role for serine 98 in the regulation of ubiquitin but not SUMO E3 ligase activity. *Biochemistry.* 30;47(52):13887-96.
- Park MA, Seok YJ, Jeong G, Lee JS.** (2007). SUMO1 negatively regulates BRCA1-mediated transcription, via modulation of promoter occupancy. *Nucleic Acids Res.*;36(1):263-83.
- Parkinson J, Everett RD.** (2000). Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins *J Virol.*;74(21):10006-17.
- Pichler A, Gast A.; Seeler, J.S., Dejean, A., Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120
- Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Körner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK.** (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol.* ;12(3):264-9.
- Potts PR.** (2009).The Yin and Yang of the MMS21-SMC5/6 SUMO ligase complex in homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 5;8(4):499-506.
- Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ.** (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19;97(26):14145-50.
- Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Le Romancer M.** (2010). Post-translational

modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors. *Med Sci (Paris)*.;26(6-7):636-40

**Qu J, Liu GH, Wu K, Han P, Wang P, Li J, Zhang X, Chen C.** (2007). Nitric oxide destabilizes Pias3 and regulates sumoylation. *PLoS One*. 31;2(10):e1085

**Rajendra R, Malegaonkar D, Pungaliya P, Marshall H, Rasheed Z, Brownell J, Liu LF, Lutzker S, Saleem A, Rubin EH.** (2004) Topors Functions as an E3 an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem*.;279(35):36440-4.

**Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F.** (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2002 May;59(5):821-31.

**Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ** (1999) Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22296-302.

**Roscic A, Möller A, Calzado MA, Renner F, Wimmer VC, Gresko E, Lüdi KS, Schmitz ML.** (2006). Phosphorylation-dependent control of Pc2 SUMO E3 ligase activity by its substrate protein HIPK2. *Mol Cell*. 6;24(1):77-89.

**Saitoh H, Hinchey J.** (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*. 3;275(9):6252-8.

**Saitoh N, Uchimura Y, Tachibana T, Sugahara S, Saitoh H, Nakao M.** (2006). In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Exp Cell Res*. 2006 May 1;312(8):1418-30.

**Sapetschnig A, Rischitor G, Braun H, Doll A, Schergaut M, Melchior F, Suske G.** (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*. 1;21(19):5206-15.

**Schmidt D, Müller S.** (2002). **Members** of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):2872-7. Epub 2002 Feb 26

**Scognamiglio A, Nebbioso A, Manzo F, Valente S, Mai A, Altucci L.**(2008). HDAC-class II specific inhibition involves HDAC proteasome-dependent degradation mediated by RANBP2. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):2030-8.

**Sedwick C.** (2008). Lessons on life from SENP2. *PLoS Biol*.;6(12):e312.

**Seeler JS, Dejean A.** (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2;4(9):690-9.

**Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L.**(2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. 2005 Nov;19(11):2671-84.

**Seufert W, Futcher B, Jentsch S.** (2005). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature*. 5;373(6509):78-81.

**Shah YM, Rowan BG.** (2005). The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol Endocrinol*.;19(3):732-48.

**Shalizi A, Gaudillière B, Yuan Z, Stegmüller J, Shirogane T, Ge Q, Tan Y, Schulman B, Harper JW, Bonni A.** (2006). A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science*. 17;311(5763):1012-7.

**Shao W, Brown M.** (2004). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*. 2004;6(1):39-52..

**Shen LN, Geoffroy MC, Jaffray EG, Hay RT.** (2009). Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J.* 26;421(2):223-30

**Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP.** (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell.* 3;24(3):331-9.

**Shuai Ke and Liu Bin .** (2005). Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 5, 593-605

**Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y.** (2005). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5;101(40):14373-8.

**Song J, Zhang Z, Hu W, Chen Y.** (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem.* 2;280(48):40122-9.

**Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guérardel C, Dejean A, Leprince D.** (2007). An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol.*;27(7):2661-75.

**Stehmeier, P., and Muller, S.** (2009). Phospho-regulated SUMO interaction stress via p300 de-SUMOylation. *EMBO J.* 28, 2748–2762

**Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, Peng J, Cheng X, Vertino PM** (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell* 30:336-347

**Subramaniam S, Mealer RG, Sixt KM, Barrow RK, Usiello A, Snyder SH.** (2010). Rhes, a physiologic regulator of sumoylation, enhances cross-sumoylation between the basic sumoylation enzymes E1 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2;285(27):20428-32.

**Sun Huaiyu, Leverson Joel D, and Hunter Tony .** (2007). Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J.* 119; 26 (18): 4102-4112.

**Sung KS, Go YY, Ahn JH, Kim YH, Kim Y, Choi CY.** (2005). Differential interactions of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by phosphorylation-dependent sumoylation. *FEBS Lett.* 6;579(14):3001-8.

**Tanaka K, Nishide J, Okazaki K, Kato H, Niwa O, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M, Murakami Y.** (1999). Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol.*;19(12):8660-72.

**Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, Palvimo JJ, Hay RT.** (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.*;10(5):538-46.

**Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S** (2008) Phosphorylation at serines to chemotherapeutic drugs *Cell Cycle*, 2011, 10 :6 : 1-4

**Tian S, Poukka H, Palvimo JJ, Jänne OA.** (2002). Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J.* 1;367(Pt 3):907-11.

**Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shupnik MA.**(2004) Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology.*;145(6):2730-8.

**Ulrich HD.** (2007). SUMO teams up with ubiquitin to manage hypoxia. *Cell.* 2007 Nov 2;131(3):446-7.

- Ulrich HD.** (2009). The SUMO system: an overview. *Methods Mol Biol.*;497:3-16.
- Um JW, Chung KC.** (2006). Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J Neurosci Res.* 15;84(7):1543-54.
- Um JW, Min DS, Rhim H, Kim J, Paik SR, Chung KC.** (2006). Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *J Biol Chem.* 10;281(6):3595-603.
- Verger A, Perdomo J, Crossley M.** (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* 2003 Feb;4(2):137-42.
- Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner PJ, Pestell RG.** (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates reactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem.*;276(21):18375-83.
- Wang J, Li A, Wang Z, Feng X, Olson EN, Schwartz RJ.** (2007). Myocardin sumoylation transactivates cardiogenic genes in pluripotent 10T1/2 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* ;27(2):622-32.
- Wang L, Banerjee S.** (2004). Differential PIAS3 expression in human malignancy. *Oncol Rep* ;11(6):1319-24.
- Weger S, Hammer E, Engstler M.** (2003). The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumoylation. *Exp Cell Res.* 15;290(1):13-27.
- Weger S, Hammer E, Heilbronn R.** (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett,* 579:5007-5012.
- Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, Curtis-Snell L, Tomes L, Watson PH, Murphy LC.** (2006). Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res.* 15;66(20):10162-70.
- Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI, Yates JR 3rd.** (2004). Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 29;279(44):45662-8.
- Woo CH, Shishido T, McClain C, Lim JH, Li JD, Yang J, Yan C, Abe J.** Extracellular signal-regulated kinase 5 SUMOylation antagonizes shear stress-induced antiinflammatory response and endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Circ Res.* 2008 Mar 14;102(5):538-45.
- Xu Z, Au SW.** (2005). Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J.* 1;386(Pt 2):325-30.
- Xu Z, Chan HY, Lam WL, Lam KH, Lam LS, Ng TB, Au SW.** (2009). SUMO proteases: redox regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal.*;11(6):1453-84
- Xu Z, Lam LS, Lam LH, Chau SF, Ng TB, Au SW.** (2008). Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *FASEB J.* ;22(1):127-37.
- Yamaguchi T, Sharma P, Athanasiou M, Kumar A, Yamada S, and Kuehn MR.** (2005). Mutation of SENP1=SuPr-2 reveals an essential role for desumoylation in mouse development. *Mol Cell Biol* 25: 5171-5182.
- Yan S, Sun X, Xiang B, Cang H, Kang X, Chen Y, Li H, Shi G, Yeh ET, Wang B, Wang X, Yi J.** (2010). Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. *EMBO J.* 17;29(22):3773-86.
- Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD.** (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* 1;25(21):5083-93.
- Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD.** (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell.*;12(1):63-74.

- Yang SH, Sharrocks AD.** (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell.* 27;13(4):611-7.
- Yang XJ, Seto E.** (2008) HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26(37), 5310–8
- Yeh ET.** (2009). SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem.*27;284(13):8223-7.
- Zhang, F. P., Mikkonen, L., Toppari, J., Palvimo, J. J., Thesleff, I. and Janne, O. A.** (2008) Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 28,5381–5390
- Zhang, H, Saitoh,H, Matunis M.J.,** (2002).Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex, *Mol. Cell. Biol.* 22 6498–6508.
- Zhou, W., Ryan, J.J., and Zhou, H.** (2004).Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 32262–32268.
- Zhu S, Goeres J, Sixt KM, Békés M, Zhang XD, Salvesen GS, Matunis MJ.** (2009). Protection from isopeptidase-mediated deconjugation regulates paralog-selective sumoylation of RanGAP1. *Mol Cell.* 2009 Mar 13;33(5):570-80.
- Zhu YL, Zhang Y, Zhu P, Yang Y, Du JW, Liu J.** (2005). Role of molecular screening for common fusion genes in the diagnosis and classification of leukemia. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 18;37(3):236-9.
- Zunino R, Braschi E, Xu L, McBride HM.** (2009).Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem.* 2009 Jun 26;284(26):17783-95. Epub 2009 May 1.
- Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride HM.** (2007).The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci.* 2007 Apr 1;120(Pt 7):1178-88. Epub 2007 Mar 6.