

UNIVERSITE DE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE NORD DE FRANCE

Année 2015

THESE D'UNIVERSITE
Mention Biochimie et Biologie Moléculaire

**Modifications post-traductionnelles de HIC1 et
de BCL11 modulant le recrutement du
complexe NuRD et mise en évidence de trois
nouveaux gènes cibles directs de HIC1**

Présentée et soutenue publiquement par
Marion DUBUISSEZ
A Lille, le 5 octobre 2015

Jury de Thèse

Pr Tony LEFEBVRE
Pr Carine VAN LINT
Dr Fabrice GOUILLEUX
Dr Anne TSICOPOULOS
Pr Olivier ROHR
Dr Dominique LEPRINCE

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

A mes parents Martine et Philippe,

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr Yvan De Launoit pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au sein de l'UMR 8161 à l'Institut de Biologie de Lille.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de Thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de Thèse et pour avoir consacré du temps afin de lire mon manuscrit :

- Pr Carine VAN LINT et Dr Fabrice GOUILLEUX en tant que rapporteurs,
- Dr Anne TSICOPOULOS et Pr Olivier ROHR en tant qu'examineurs.

Je remercie également le Pr Tony LEFEBVRE pour avoir accepté de présider mon jury de Thèse et de se replonger dans le monde de HIC1.

Je remercie l'Université de Lille 1 puis le CNRS pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de Thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Dominique Leprince ou « Chef » pour m'avoir permis de réaliser ma Thèse au sein de son équipe que je qualifierai de « Petite mais costaud ». Merci de m'avoir encadré tout au long de ses cinq dernières années et de m'avoir transmis la passion de la Recherche même si ce n'est jamais aussi simple que ce que l'on souhaiterait. Petite M2R ignorante du monde de HIC1 et de BCL11, ton expertise et ta confiance m'ont mené jusqu'ici aujourd'hui. Et oui, le Chef a toujours raison...

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe HIC1, passés et présents :

- Gaylor, l'ancien « petit thésard devenu GRAND », tu m'as donné l'envie de me lancer dans l'aventure incroyable qu'est une thèse. Tu m'as transmis la plupart des connaissances « techniques » dont la

« fameuse » ChIPqPCR mais aussi toutes ces petites manies avant de lancer une RT-qPCR sur la paillasse « ARN ». Si j'écris ceci c'est que je suis bientôt « GRANDE » à mon tour et je te remercie pour ton soutien et tes conseils des « States », ce fut une expérience incroyable et intense !

- Ingrid, ma petite Assistante adorée qui est devenue au fil des ans, une amie sincère et toujours dévouée. Tu m'as tout d'abord appris la fameuse technique de Co-IP et puis, tu m'as épaulé tout au long de ma Thèse en réalisant beaucoup, beaucoup, beaucoup...de manipulations pour mon projet de Thèse mais aussi en me réconfortant dans les moments de doute. Et puis, j'ai pu découvrir une personne pleine de gentillesse et de bonne volonté avec qui j'ai passé des moments mémorables et de bonnes parties de plaisir. En effet, tu as toujours la petite remarque remplie d'humour et dite avec tellement de naturel qui m'as permis de travailler dans une ambiance joviale tout au long de ces cinq dernières années.
- Sonia, la petite dernière à s'être lancée dans l'aventure de la Thèse, que j'ai coachée au début et qui maintenant m'aide à terminer mes travaux. Bon courage pour la fin de ta Thèse et surtout ne sois pas trop pressée dans tes manipulations, ce n'est jamais une bonne chose ! Je te lègue la responsabilité du développeur mais aussi de notre chère Tassimo, prends-en grand soin !
- Vanessa que j'ai connue lors de son post-doc au sein de l'équipe et qui aujourd'hui, nous a rejoint comme Maître de conférence. Merci pour tous ces conseils pertinents mais aussi pour tes moments de « pétages de plomb » auxquels j'ai participé, notamment, en fin de thèse.
- Et la dernière arrivée, Nathalie ! J'ai adoré le peu de temps passé en ta compagnie, ce fut un réel plaisir et tes pâtisseries sont délicieuses !

Je n'oublie pas également notre « Super » secrétaire, Nicole, toujours « au taquet » lorsqu'il est question de commandes ou de papiers administratifs !

Je remercie aussi les collègues du labo avec qui j'ai partagé tous mes déjeuners à 11h30 et ceux avec qui j'ai pu discuter de manips ou autres dans un couloir.

Et bien sûr, merci aux copains, copines de Thèse, Rémi, Solange, Maud et Sabrina qui ont réussi brillamment leur Thèse, mais surtout merci à Joe, mon voisin de dent 2. Mention spéciale pour toi avec qui j'ai pu découvrir tous les aléas du M2R et puis ceux beaucoup plus nombreux de la Thèse. Toutes ces discussions de manips et autres en fin de journée m'ont été d'une grande aide, pouvoir se serrer les coudes dans les moments difficiles mais surtout pouvoir s'encourager l'un et l'autre. Finalement après cinq années passés côte à côte, nous y sommes presque!! A l'avenir, nous ne serons plus voisins de dent 2 mais nous serons dans des pays qui eux sont voisins USA/Canada !

Enfin, pour terminer, un grand merci à ma famille pour m'avoir soutenue à leur manière dans cette grande expérience où ils ne comprennent pas grand-chose! Et surtout, merci à Anthony qui m'a apporté le plus grand soutien que j'aurai pu espérer : notre chère Anne qui a maintenant 19 mois ! Et oui, ma Thèse fut une expérience très enrichissante tant au niveau professionnel que privé !

RESUME

La famille des protéines MTA (Metastasis Tumor Antigen) compte trois membres MTA1, 2 et 3 qui diffèrent principalement au niveau de leur extrémité C-terminale. Cette région C-terminale est complètement désorganisée et aucun domaine fonctionnel n'a été identifié. Par contre, la région N-terminale est conservée parmi ces protéines et est organisée en quatre domaines fonctionnels impliqués dans l'interaction avec le complexe NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase complex). Le complexe NuRD est le complexe majeur de remodelage de la chromatine et de désacétylation des histones, qui est recruté par des facteurs de transcription au niveau de leurs gènes cibles principalement pour réprimer la transcription. Les facteurs de transcription HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) et BCL11 (B-Cell Leukemia 11) recrutent le complexe NuRD grâce à une interaction avec les protéines MTA afin de réprimer leurs gènes cibles.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux modalités d'interactions entre les protéines HIC1 et BCL11 interagissant toutes deux avec les protéines MTA. L'extrémité C-terminale des protéines MTA est impliquée dans l'interaction avec HIC1 et BCL11. Dans ce cadre, nous avons déterminé si la formation d'un complexe ternaire HIC1-BCL11-MTA en faveur d'une régulation synergique de gènes cibles communs était envisageable. L'interaction HIC1-BCL11 étant indépendante de leur fixation à la chromatine, elle ne semble pas forcément jouer un rôle direct dans la régulation synergique de gènes cibles communs.

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé l'interaction entre les protéines BCL11 et les protéines MTA. Nous avons montré que les protéines BCL11 interagissent avec les trois protéines MTA via leur motif N-terminale conservé MSRRKQ et sont donc capables de recruter différents complexes NuRD. De plus, nous avons mis en évidence que la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B médiée par PKC (Protein Kinase C) lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺, régule son activité de facteur de transcription. De manière plus précise, dans des lymphocytes T CD4⁺ non activés, BCL11B

réprime la transcription de l'*IL2* en recrutant le complexe NuRD via les protéines MTA. Puis, suite à l'activation des lymphocytes T CD4⁺, PKC est activée et phosphoryle BCL11B sur la Sérine 2 inhibant ainsi l'interaction avec les protéines MTA et donc le recrutement du complexe NuRD. BCL11B est également SUMOylée indépendamment de cette phosphorylation, lui permettant de recruter le coactivateur P300 pour activer la transcription de l'*IL2*. Enfin, pour stopper l'activation des lymphocytes T CD4⁺, la transcription de *BCL11B* est réprimée. En résumé, la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B permet le passage d'un répresseur à un activateur transcriptionnel lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

En parallèle à cette étude, nous avons également montré une activation transcriptionnelle de HIC1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés. De manière corrélative, nous avons identifié *CXCL12/SDF1* comme nouveau gène cible de HIC1 dans les lymphocytes T CD4⁺. La chimiokine CXCL12/SDF1 est le ligand commun aux récepteurs couplés aux protéines G, CXCR4 et CXCR7. Cette voie de signalisation participe à la migration et au « homing » des cellules de l'immunité.

De plus, nous avons également identifié deux nouveaux gènes cibles de HIC1 : *ApoER2* et *VLDLR* codant tous deux des récepteurs à la Reelin. Cette voie de signalisation est impliquée dans la migration des précurseurs neuronaux pendant le développement du cervelet.

Au final, mes travaux de Thèse ont permis l'étude de la régulation des protéines HIC1 et BCL11 par des modifications post-traductionnelles (MPTs) telles que la SUMOylation et la phosphorylation modulant le recrutement du complexe NuRD et la mise en évidence de trois nouveaux gènes cibles directs de HIC1.

ABSTRACT

MTA (Metastasis Tumor Antigen) proteins family is composed of three members: MTA1, 2 and 3 which mainly differ in their C-terminus. This C-terminal region is completely disorganized and no functional domain has been identified so far. In contrast, the N-terminal region is well conserved among these proteins and is divided into four functional domains involved in the interaction with the NuRD complex (Nucleosome Remodelling and Deacetylase complex). NuRD is the main chromatin remodeling and histone deacetylation complex which is recruited by transcription factors at their target genes mostly to repress transcription. HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) and BCL11 (B-Cell Leukemia 11) are two transcription factors recruiting NuRD through interaction with MTA proteins to repress their target genes.

In the first part of my work, we have deciphered the mechanisms of interactions between HIC1 and BCL11 proteins which both also interacted with MTA proteins. Indeed, the C-terminus of these proteins is involved in the interaction with BCL11 and HIC1. In this context, we determined if the formation of a HIC1-BCL11-MTA ternary complex involved in the synergistic regulation of common target genes was possible. We have shown that HIC1-BCL11 interaction is independent of their localization to chromatin, suggesting that this interaction does not allow the direct synergistic repression of common target genes.

In the second part of my work, we characterized the interaction between the BCL11 and MTA proteins. We showed that BCL11 proteins interact with the three MTA members via their conserved MSRRKQ motif to recruit NuRD complexes. Furthermore, we identified the PKC (Protein Kinase C)-mediated phosphorylation of BCL11B Serine 2 which regulates its transcription factor's activity during activation of human CD4⁺ T lymphocytes. Specifically, in inactivated CD4⁺ T cells, BCL11B represses transcription of *IL2* by recruiting NuRD complex via MTA proteins. Then, following activation of CD4⁺ T cells, PKC is activated and phosphorylates

BCL11B Serine 2, thereby inhibiting its interaction with MTA proteins and thus with NuRD. Then, BCL11B SUMOylation allows the recruitment of the P300 coactivator to activate transcription of *IL2*. Finally, to stop the activation of CD4⁺ T cells, *BCL11B* transcription is downregulated. In summary, the phosphorylation of BCL11B Serine 2 allows the switch from a transcriptional repressor to an activator during TCR activation of human CD4⁺ T cells.

In parallel to this work, we demonstrated that HIC1's transcriptional levels are increased during activation of human CD4⁺ T cells. Correlatively, we identified *SDF1* as a new direct target gene of HIC1 in these cells. The SDF1 chemokine is the common ligand for chemokine receptors CXCR4 and CXCR7. This signaling pathway is involved in the migration and in the homing of immune cells.

In addition, we also identified two other new direct target genes HIC1: *ApoER2* and *VLDLR* encoding both receptors for Reelin. This signaling pathway is involved in the migration of neuronal precursors during cerebellar development.

In conclusion, my Thesis work has allowed the study of the regulation of HIC1 and BCL11B proteins by post-translational modifications (PTMs) such as phosphorylation and SUMOylation modulating the recruitment of NuRD complex and has also identified three new direct target genes of HIC1.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	5
Résumé	8
Abstract	10
Table des matières	13
Abréviations	19
Index des figures	23
Introduction	27
1 L'épigénétique	29
1.1 La chromatine	29
1.2 Notion d'épigénétique	31
1.3 Le « code » des histones	31
1.4 La méthylation et la déméthylation de l'ADN	33
1.5 Les mi-ARNs ou micro-ARNs	34
1.6 Quelques exemples de complexes de remodelage de la chromatine	35
1.6.1 Les complexes Polycomb	35
1.6.2 Les complexes NuRD	36
1.6.3 Le coactivateur P300	36
1.7 Corrélations génétiques et épigénétiques dans le cancer	37
1.8 Thérapies épigénétiques anticancéreuses ou « épidrogues »	38
2 Les modifications post-traductionnelles des protéines non-histones	39
2.1 La SUMOylation	39
2.2 La phosphorylation	39
2.3 L'acétylation	40
2.4 La O-GlcNAcylation	40
3 Le complexe NuRD (Nucleosome and Remodelling Deacetylase)	41
3.1 Composition du complexe NuRD	41
3.1.1 Les ATPases CHD3, CHD4 et CHD5	42
3.1.2 HDAC1/2	43

3.1.3	P66 α / β _____	45
3.1.4	RbAp46/RbAp48 _____	46
3.1.5	MBD2/MBD3 _____	47
3.2	Rôles du complexe NuRD _____	49
3.2.1	Longtemps qualifié comme répresseur transcriptionnel... ____	49
3.2.2	Puis reconnu également activateur transcriptionnel ... _____	49
3.2.3	Et aussi régulateur d'autres complexes protéiques... _____	50
3.2.4	Mais, jouant aussi des rôles non transcriptionnels. _____	51
4	Les protéines MTA1/2/3 _____	55
4.1	Découverte _____	55
4.1.1	MTA1, le fondateur de la trilogie _____	55
4.1.2	MTA2 et MTA3 _____	55
4.1.3	Expression des protéines MTA et leur régulation _____	56
4.1.4	Structure des protéines MTA _____	57
4.1.5	Localisation subcellulaire des protéines MTA _____	58
4.2	Rôles des protéines MTAs dépendants du complexe NuRD _____	59
4.3	Rôles des protéines MTAs indépendants du complexe NuRD _____	60
4.4	Rôles des deux isoformes de MTA1 : MTA1s et ZG29p _____	62
4.4.1	MTA1s : « Petit mais costaud » _____	62
4.4.2	MTA1-ZG29p : un variant protéique spécifique du pancréas _____	62
4.5	Régulation des protéines MTAs par des MPTs _____	63
4.5.1	Les rôles opposés de l'acétylation de MTA1 _____	63
4.5.2	La SUMOylation et le motif SIM de MTA1 _____	64
4.5.3	La méthylation et déméthylation de MTA1 _____	64
4.5.4	L'ubiquitination de MTA1 _____	65
4.6	Les protéines MTA dans le cancer _____	65
5	Le gène suppresseur de tumeurs HIC1 _____	67
5.1	Découverte et structure du gène _____	67
5.2	Régulation de l'expression de HIC1 _____	68
5.3	Perte d'expression de HIC1 dans les cancers _____	68
5.3.1	Hyperméthylation du promoteur _____	68
5.3.2	Gène suppresseur de tumeurs _____	69

5.4	HIC1 dans le syndrome de Miller-Dieker _____	70
5.5	Structure de la protéine HIC1 _____	71
5.6	Rôle de répresseur transcriptionnel _____	72
5.6.1	Recrutement des protéines CtBPs _____	73
5.6.2	Recrutement du complexe NuRD _____	74
5.6.3	Recrutement du complexe SWI/SNF _____	75
5.6.4	Recrutement du complexe PRC2 _____	75
5.6.5	HIC1 Réprime également d'autres gènes _____	77
5.7	Autres rôles _____	79
5.7.1	Dans la régulation d'autres facteurs de transcription _____	79
5.7.2	Dans la réparation des dommages à l'ADN _____	81
5.8	Régulation de HIC1 par des MPTs _____	83
5.8.1	La compétition acétylation/SUMOylation de la lysine 314 ____	83
5.8.2	La O-GlcNAcylation de HIC1 _____	84
5.8.3	La phosphorylation et l'acétylation de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN _____	84
6	Les protéines BCL11 _____	87
6.1	Découverte des protéines BCL11 _____	87
6.1.1	Baptisée Evi9 chez la souris puis BCL11A chez l'homme ____	87
6.1.2	Nommée CTIP2 mais aussi Bcl11b et plus tard Rit1 _____	88
6.2	Structure des protéines BCL11 _____	88
6.3	La variété des rôles des protéines BCL11 _____	90
6.3.1	« Sœurs rivales » dans le développement du système immunitaire _____	90
6.3.2	BCL11A dans la régulation de l'hémoglobine fœtale _____	92
6.3.3	BCL11B dans le développement des neurones _____	94
6.3.4	BCL11B dans le développement de la peau et des dents ____	95
6.3.5	BCL11B et le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) __	95
6.3.6	BCL11A, oncogène ou gène suppresseur de tumeurs ? _____	97
6.3.7	BCL11B, un gène suppresseur de tumeurs très particulier __	97
6.3.8	La conservation d'un allèle fonctionnel n'est pas due au hasard ! _____	98
6.4	Cofacteurs ou facteurs de transcription ? _____	99

6.4.1	Découvert en tant que corépresseur..._____	99
6.4.2	Puis répresseur transcriptionnel... _____	99
6.4.3	Et activateur transcriptionnel..._____	100
6.4.4	Ou encore régulateur bimodal. _____	101
6.4.5	BCL11 et BCL6 _____	102
<i>Hypothèses de travail</i> _____		103
<i>Résultats</i> _____		107
1	Publication n°1 _____	109
2	Publication n°2 _____	137
3	Caractérisation de l'interaction entre HIC1 et MTA1 _____	163
3.1	Régions de HIC1 impliquées dans l'interaction avec MTA1 _____	163
3.2	Régulation de ces interactions par des modifications post- traductionnelles _____	166
3.2.1	La méthylation de MTA1 _____	166
3.2.2	La SUMOylation et le motif SIM (SUMO-interacting Motif) de MTA1 _____	170
3.3	Rôle de l'interaction HIC1-MTA1 dans la réponse immunitaire _	171
4	Publication n°3 _____	177
<i>Discussion Générale</i> _____		179
<i>Bibliographie</i> _____		199
<i>Annexes</i> _____		223
1	Publication n°4 _____	225
2	Publication n°5 _____	227
3	Publication n°6 _____	229

ABREVIATIONS

AA	Acides Aminés
ADN	Acide désoxyribonucléotidique
ARN	Acide ribonucléotidique
ARNm	ARN messenger
ARN Pol II	ARN Polymérase II
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénine Tri-Phosphate
BAH	Bromo-Adjacent-Homology
BCAS3	Breast Cancer Amplified Sequence 3
BCL6	B-Cell Lymphoma 6
BCL11	B-Cell Leukemia/Lymphoma 11
BET	Bromo and Extra-terminal
BRD	Bromodomain containing protein
BTB/POZ finger	Broad complex, Tramtrack and Bric à brac/POxviruses and Zinc finger
CC	Coiled Coil
CD	Chromodomaine
ChIP-Seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage
Chk1	Cell-cycle chekpoint kinase 1
CKII	Caséine Kinase II
Co-IP	Co-immunoprécipitation
CpG	dinucléotide cytosine-gaunine
CR	Conserved Region
CtBP	C-terminal binding protein
CXCL12	CXC motif Ligand 12
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
DNMT	DNA méthyltransférase
DNTP	Désoxy-Nucléotides Tri-Phosphate
EED	Embryonic Ectoderm Development
ELM2	Egl-27 and MTA1 homology 2
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ER	Estrogen Receptor
ES	cellules souches embryonnaires
Evi9	Ecotropic viral integration site 9
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-BP1	Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1
FOG	Friend Of GATA
GATA	Globin transcription factor
HAT	Histone Acétyl-Transférase
HbA	Hémoglobine Adulte
HbF	Hémoglobine Foetale
HDAC	Histone Désacétylase
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HiRE	HIC1 Responsive Element

HKMT	Histone méthyltransférase
HRG22	HIC1 Related Gene on Chromosome 22
hPCL3	human Polycomb-like 3
IDR	Intrinsically Disorder Region
iPS	cellules souches induites
kDa	kiloDalton
KLF1	Krüppel-Like Factor 1
LSD1	Lysine-specific Demethylase 1
LOH	Loss Of Heterozygosity
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBD	Methyl Binding Domain
MBP	Methyl CpG Binding Protein
MDS	syndrome de Miller-Diecker
MiRNA	microARN
MSN	GABAergic Medium-sized Spiny Neurons
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MTA	Metastasis Tumor Antigen
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NK	Natural Killer
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NuRD	Nucleosome Remodelling and Deacetylase complex
NURF	Nucleosome Remodelling Factor
O-GlcNAc	O-linked N-acétylglucosamine
OGA	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc Transférase
PARP	PolyADP Ribose Polymérase
PEST	peptide signal riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)
PHC	Polyhomeotic
PHD	Plant Homeodomain
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PKC	Protein Kinase C
PRC	Polycomb Repressive Complex
Ptch1	Patched 1
Rb	Retinoblastoma
RbAp46/48	Retinoblastoma Associated protein p46/48
RC	Région Centrale
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
Rit1	Radiation induced tumor suppressor gene 1
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SANT	SWI/ADA2/NCoR/TFIIIB
SDF1	Stromal cell-Derived Factor 1
SEN1	SENtrin/SUMO specific Protease
SIRT1	Silent mating type information regulation 2 homolog 1
Sox9	Sex determining region Y-box protein 9
SUMO	Small Ubiquitin-like MOdifier
Suz12	Suppressor of Zeste 12
SWI/SNF	SWItching and Sucrose Non-Fermenting

TAD	domaine de transactivation
TCF4	T Cell Factor 4
TCR	T-Cell Receptor
Tet	Ten eleven translocation
ThPOK	T-helper inducing POZ-Kruppel like factor
Ubc9	Ubiquitin-like protein SUMO1 conjugating protein
UTR	Untranslated region
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSN	Vomeronasal Sensory Neuron
Wnt	Wingless integration site
Xist	X inactive-specific transcript
ZF	Zinc Finger

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 1 : Représentation schématique d'un nucléosome</i> _____	29
<i>Figure 2 : Inactivation du chromosome X (Trojer and Reinberg, 2007)</i> _____	30
<i>Figure 3 : Modèle de régulation du recrutement du complexe NuRD par des MPTs au niveau de l'histone H3 (Nishioka et al., 2002)</i> _____	32
<i>Figure 4 : Mise en place de la répression transcriptionnelle par les complexes Polycomb : EZH2 triméthyle H3K27 (Me3) puis, PRC1 reconnaît H3K27me3 et RING1A ubiquitine H2AK119 (Ub).</i> _____	36
<i>Figure 5 : Représentation schématique du complexe NuRD</i> _____	42
<i>Figure 6 : Structure schématique des protéines CHD3/4/5</i> _____	42
<i>Figure 7 : Structure schématique des désacétylases HDAC1/HDAC2</i> _____	44
<i>Figure 8 : Structure schématique des protéines P66a/β</i> _____	45
<i>Figure 9 : Schéma des protéines RbAp46/RbAp48</i> _____	46
<i>Figure 10 : Structure schématique des protéines MBD2 et MBD3</i> _____	47
<i>Figure 11 : Coopération entre les complexes NuRD et PRC2 pour la mise en place des gènes bivalents dans les cellules souches embryonnaires</i> _____	51
<i>Figure 12 : Schémas de MTA1 et de ses deux variants : MTA1s et ZG29p</i> __	55
<i>Figure 13 : Schémas de MTA2, MTA3 et son variant MTA3L</i> _____	56
<i>Figure 14 : Structure schématique représentant MTA1</i> _____	57
<i>Figure 15 : Schémas récapitulatif des MPTs régulant MTA1</i> _____	63
<i>Figure 16 : Représentation schématique du locus codant le gène HIC1 (adaptée de (Fleuriel et al., 2009))</i> _____	67
<i>Figure 17 : Structure schématique de HIC1 pouvant recruter différents complexes ou protéines corépresseurs</i> _____	72
<i>Figure 18 : HIC1 recrute CtBP pour réprimer SIRT1 et CXCR7</i> _____	73

<i>Figure 19 : HIC1 réprime P57KIP2, Cycline D1 et EphA2 en recrutant le complexe NuRD.</i>	74
<i>Figure 20 : HIC1 recrute le complexe SWI/SNF pour réprimer ATOH1</i>	75
<i>Figure 21 : Rôle des protéines hPCL3 dans la mise en place de la répression transcriptionnelle au niveau d'une région génique transcriptionnellement active.</i>	76
<i>Figure 22 : HIC1 réprime ATOH1, EFNA1 et CXCR7 en recrutant le complexe PRC2</i>	77
<i>Figure 23 : Récapitulatif des gènes cibles directs de HIC1 : HIC1 réprime des gènes régulant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires mais aussi impliqués dans le développement embryonnaire et dans la réponse à différents stress tels que les dommages à l'ADN.</i>	79
<i>Figure 24 : HIC1 régule négativement l'activité de TCF4 en le séquestrant dans des « HIC1 bodies » (A) et l'activité de STAT3 en interagissant avec son domaine de fixation à l'ADN (B).</i>	80
<i>Figure 25 : Boucles de régulation impliquant (A) HIC1, SIRT1, P53 et P21 et, (B) HIC1, E2F1 et SIRT1. Des dommages à l'ADN induisent les événements colorés en rouge.</i>	81
<i>Figure 26 : Régulation des MPTs au niveau de la lysine 314 de HIC1</i>	83
<i>Figure 27 : Schémas récapitulatif des MPTs modulant les rôles de HIC1</i>	85
<i>Figure 28 : Schéma des quatre isoformes de BCL11A et de BCL11B</i>	87
<i>Figure 29 : Structure schématique de BCL11B et localisation des domaines d'interactions avec les différents complexes et protéines corépresseurs (adaptée de (Kominami, 2012))</i>	89
<i>Figure 30 : Schéma simplifié du développement des lymphocytes T à partir des thymocytes, les éléments colorés en rouge sont régulés par Bcl11b (Kominami, 2012).</i>	90
<i>Figure 31 : Implication de BCL11A dans la régulation de l'HbF.</i>	93

<i>Figure 32 : Schémas récapitulatif des rôles de BCL11B dans la mise en place et la persistance de la latence du VIH</i>	97
<i>Figure 33 : Rôle de répresseur transcriptionnel de BCL11B</i>	100
<i>Figure 34 : Rôle d'activateur transcriptionnel de BCL11B</i>	101
<i>Figure 35 : BCL11B, régulateur bimodal dans les thymocytes murins</i>	101
<i>Figure 36 : Schéma représentant l'extrémité C-terminale des protéines MTA comme plateforme d'interactions liant les MPTs des régulateurs transcriptionnels au recrutement du complexe NuRD</i>	103
<i>Figure 37 : Schémas des mutants de HIC1</i>	163
<i>Figure 38 : Le motif MKHEP de HIC1 est impliqué dans l'interaction avec MTA1</i>	164
<i>Figure 39 : Le motif MKHEP de HIC1 est nécessaire à l'interaction avec MTA1</i>	164
<i>Figure 40 : Test de répression transcriptionnelle de la construction 305-326 de HIC1 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4</i>	165
<i>Figure 41 : La déméthylation de MTA1 par LSD1 diminue l'interaction avec HIC1</i>	167
<i>Figure 42 : La non-méthylation de MTA1 inhibe l'interaction avec la protéine HIC1</i>	168
<i>Figure 43 : Schémas récapitulatif des effets de la déméthylation de MTA1 sur l'interaction avec HIC1</i>	168
<i>Figure 44 : La déméthylation de MTA1 diminue l'interaction avec BCL11B</i>	169
<i>Figure 45 : La SUMOylation de MTA1 n'influence pas l'interaction avec HIC1. (* représente une bande non spécifique)</i>	170
<i>Figure 46 : Le motif SIM de MTA1 est impliqué dans l'interaction avec HIC1</i>	171
<i>Figure 47 : L'activation des lymphocytes T CD4⁺ induit l'activation de HIC1 au niveau ARN (A) et au niveau protéique (B). La flèche noire représente une forme potentiellement SUMOylée de HIC1.</i>	172

Figure 48 : Etude de l'activation de HIC1 au niveau ARN entre les populations différentes de lymphocytes T CD4⁺ activés ou non _____ 173

Figure 49 : L'activation des lymphocytes T CD4⁺ induit la diminution de l'expression des récepteurs CXCR4 (B), CXCR7 (C) et de leur ligand commun SDF1 (A). _____ 174

Figure 50 : HIC1 se fixe sur le promoteur de SDF1 dans les LT CD4⁺ _____ 174

Figure 51 : Modèle du rôle de HIC1 dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ _____ 175

Figure 52 : Modèle du recrutement spécifique du complexe NuRD par GATA1/FOG1 (Lejon et al., 2011) _____ 183

Figure 53 : Modèle proposé pour la régulation du recrutement du complexe NuRD par BCL11B dans les lymphocytes T CD4⁺ non activés (A) et activés (B). _____ 184

Figure 54 : Répressions transcriptionnelles potentiellement mises en place par HIC1 et BCL11B _____ 188

Figure 55 : Autres rôles de l'interaction HIC1-BCL11B _____ 189

Figure 56 : HIC1 réprime SDF1 et, peut-être BCL11B dans les lymphocytes T CD4⁺ activés _____ 189

Figure 57 : Modalités d'interactions entre les protéines HIC1, BCL6 et BC11 en lien avec le complexe NuRD _____ 192

INTRODUCTION

Cette introduction générale a pour but de définir le contexte de l'épigénétique au cours de ma thèse et en particulier de faire un bilan des connaissances à propos du complexe NuRD et plus précisément, des sous-unités protéiques MTA (Metastasis associated gene) en lien avec les facteurs de transcription HIC1 et BCL11B, qui ont constitué l'axe central de mon travail de Thèse.

1 L'épigénétique

1.1 La chromatine

Dans la cellule eucaryote, l'ADN (acide désoxyribonucléotidique) n'est pas nu mais il existe sous une forme condensée appelée la chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome qui consiste en un octamère de protéines histones résultant d'un tétramère H3-H4 et de deux dimères H2A-H2B, autour duquel s'enroule l'ADN (147 bp). L'ensemble est maintenu par une histone H1 qui sert de « linker » (Figure 1) (Kouzarides, 2007).

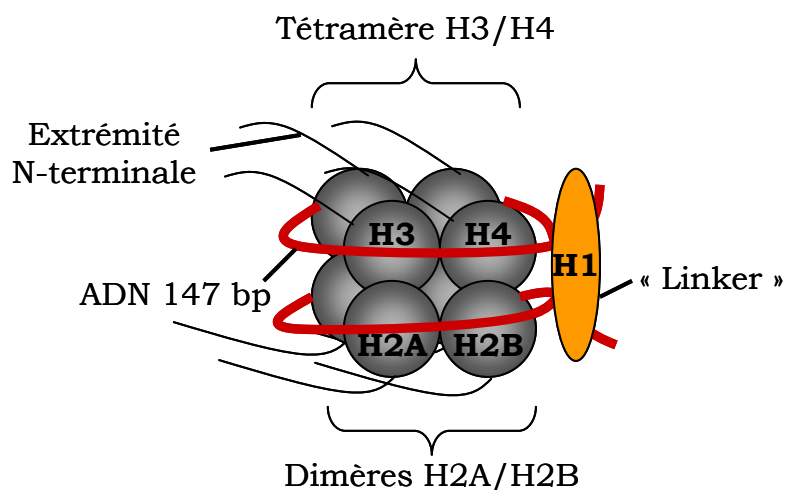


Figure 1 : Représentation schématique d'un nucléosome

Il existe deux types de chromatine selon le niveau de condensation de l'ADN :

- l'euchromatine correspondant à l'état actif de l'ADN, c'est-à-dire que l'ADN est accessible pour la fixation de protéines impliquées dans la transcription, la réparation, la réplication et/ou la condensation
- l'hétérochromatine correspondant à un état « silencieux » de l'ADN : cet état peut-être constitutif, au niveau des extrémités des télomères et au niveau des centromères ou facultatif au niveau des régions géniques exprimées au cours du développement et/ou de la différenciation et qui sont ensuite éteints.

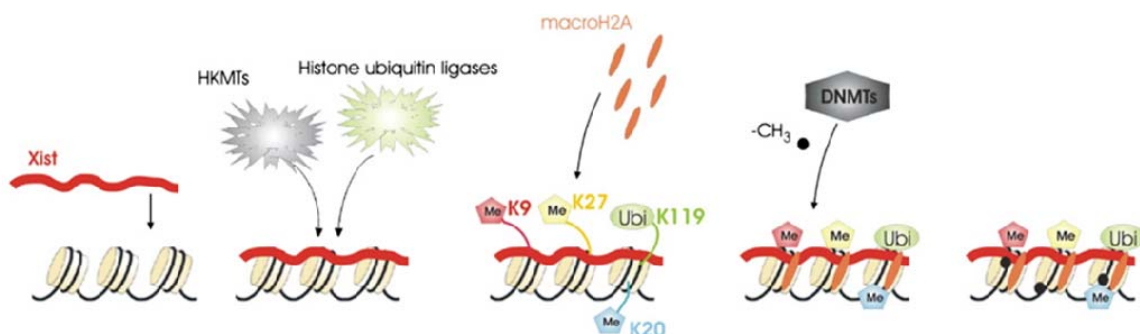


Figure 2 : Inactivation du chromosome X (Trojer and Reinberg, 2007)

Un des plus beaux modèles pour illustrer le passage de l'euchromatine à l'hétérochromatine est l'inactivation d'un des deux chromosomes X (Xi) dans les cellules de mammifères femelles qui se déroule juste avant la gastrulation de l'embryon. Cette inactivation sera stable durant toute la vie du mammifère. Elle se déroule en plusieurs étapes successives : l'ARN (acide ribonucléotidique) non codant Xist (X inactive-specific transcript) est d'abord exprimé à partir du chromosome Xi et se fixe alors sur le chromosome Xi. Puis, s'ensuit une hypoacétylation et la méthylation des histones sous l'action d'histone méthyltransférases (HKMTs) telle que H3K27me3 par les complexes Polycomb (PRC, Polycomb Repressive Complex) et enfin l'incorporation du variant H2A macro et la méthylation de l'ADN par des DNA méthyltransférases (DNMTs) pour induire la formation d'hétérochromatine (Figure 2) (Trojer and Reinberg, 2007).

Dans ce modèle, le passage de l'euchromatine à l'hétérochromatine est la conséquence de plusieurs modifications épigénétiques successives.

1.2 Notion d'épigénétique

En 1942, le Professeur Conrad Waddington proposait le terme épigénétique ou épigénotype pour désigner « l'étude des interactions entre les gènes et leurs produits responsables du phénotype » (Waddington, 2012). Aujourd'hui, de manière générale, l'épigénétique consiste en l'étude du changement héréditaire mais réversible de l'expression des gènes sans altérations de la séquence nucléotidique. Elle comprend trois processus principaux qui sont : les modifications post-traductionnelles (MPTs) des histones ou « code » des histones, la méthylation/déméthylation de l'ADN et la production d'ARN non codant (les micro-ARN (miRNA)).

1.3 Le « code » des histones

Les histones sont des protéines associées à l'ADN constituées d'un domaine globulaire et d'une extrémité N-terminale non structurée (Figure 1). Cette extrémité N-terminale, située en dehors du nucléosome, possède des résidus tels que des lysines ou la sérines modifiés post-traductionnellement selon le contexte cellulaire (stress, mitose, mort cellulaire). Ces modifications post-traductionnelles ou marques épigénétiques constituent le code des histones et sont « écrites » ou « effacées » par des complexes protéiques contenant des protéines pourvues d'une activité catalytique et « lues » par des complexes effecteurs. Les modifications principales des histones comprennent l'acétylation/désacétylation, la phosphorylation/déphosphorylation, la méthylation/déméthylation, la SUMOylation et la O-GlcNAcylation. Elles sont catalysées par des enzymes spécifiques telles que les histones acétyltransférases (HAT), les histones désacétylases (HDAC), les méthyltransférases et les déméthylases. Elles ont pour fonction de réguler la structure de la chromatine par deux mécanismes :

- Le premier mécanisme est l'inhibition des contacts entre les nucléosomes pour favoriser un état « ouvert » de la chromatine. Il module les contacts entre les histones de nucléosomes adjacents et/ou l'interaction des histones avec l'ADN.
- Le deuxième est le recrutement de protéines non-histones qui interagissent sélectivement avec une modification d'histone. Ces protéines reconnaissent et « interprètent » les différentes modifications des histones par leur domaine spécifique : un chromo-domaine reconnaît les histones méthylées alors qu'un bromodomaine reconnaît celles acétylées. Ces protéines appartiennent à des complexes à activité transcriptionnelle permettant de réprimer ou d'activer la transcription.

Mais, certaines modifications d'histones empêchent l'interaction de protéines non-histones avec l'ADN comme par exemple H3K4me3 qui empêche la liaison du complexe NuRD. En effet, H3K4me3 n'étant pas un site de liaison du complexe NuRD, cette MPT interfère dans l'interaction entre le complexe NuRD et l'histone H3, NuRD se liant préférentiellement à H3K4 non modifiée et H3K9ac (Figure 3) (Nishioka et al., 2002).

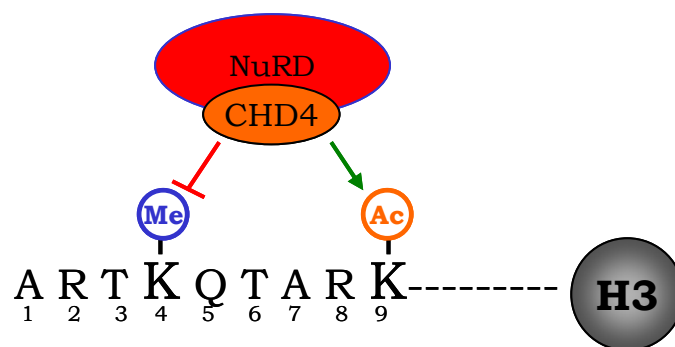


Figure 3 : Modèle de régulation du recrutement du complexe NuRD par des MPTs au niveau de l'histone H3 (Nishioka et al., 2002)

Les modifications des histones permettent donc d'établir un environnement chromatinien (euchromatine, hétérochromatine) et d'orchestrer des processus basés sur l'ADN tels que la réparation, la transcription ou encore la réplication (Kouzarides, 2007). De plus, il existe un dialogue entre les modifications des histones, c'est-à-dire qu'une

modification peut en contrôler une autre et qu'il existe une coopération entre les modifications (Bannister and Kouzarides, 2011). Dès 2001, Jenuwein et al. proposaient l'existence d'un code des histones qui signifie qu'en fonction de la combinaison des modifications post-traductionnelles des histones, la régulation des gènes est différente (Jenuwein and Allis, 2001). Aujourd'hui, le seul complexe corépresseur étant associé à la fois à la méthylation de l'ADN et aux modifications post-traductionnelles des histones est le complexe NuRD.

1.4 La méthylation et la déméthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification covalente de l'ADN catalysée par une DNA méthyltransférase (DNMT). Chez les mammifères, elle consiste en l'ajout d'un groupe méthyl sur la cytosine des dinucléotides CG (CpG). Il existe deux types de DNA méthyltransférase : DNMT3a, DNMT3b sont responsables de la méthylation de nouveaux sites CpG ou méthylation « de novo » alors que, DNMT1 maintient le profil de méthylation sur le nouveau brin d'ADN lors de la réplication de l'ADN. Chez la souris, DNMT3 se fixe aux régions péri-centrométriques de l'hétérochromatine grâce à un domaine PWWP conservé chez les mammifères. DNMT3 peut également être recrutée au niveau de gènes cibles par des répresseurs transcriptionnels pour agir en tant que corépresseur. En effet, le facteur de transcription Myc recrute DNMT3a au niveau du promoteur de *p21* pour réprimer sa transcription (Brenner et al., 2005). La méthylation induit la répression des gènes par deux mécanismes : elle inhibe la transcription des gènes en empêchant l'association de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) à l'ADN et elle est reconnue par des protéines MBPs (Methyl-CpG Binding Protein) qui recrutent des complexes de répression transcriptionnelle tel que le complexe NuRD. Les protéines MBPs possèdent un domaine MBD (Methyl-CpG Binding Domain) qui permet de fixer les dinucléotides CpG méthylés. Chez les mammifères, la famille des protéines MBPs compte 5 membres : MBD1 à MBD4 et MeCP2. Seul MBD3 possède un domaine MBD incapable de fixer les CpG méthylés (Klose and Bird, 2006). Longtemps, la méthylation de

l'ADN a été considérée comme stable et irréversible. En effet, seul le « mauvais » maintien de la méthylation par DNMT1 causait une perte de méthylation lors de la réplication de l'ADN (Chen et al., 2003a). Récemment, de nombreuses études ont montré que les protéines TET (Ten-Eleven Translocation), au nombre de trois, sont capables de déméthylater l'ADN (Tahiliani et al., 2009). Les protéines TET sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine. Puis, s'ensuit une série d'autres réactions enzymatiques pour revenir à une cytosine non modifiée qui peut alors être à nouveau méthylée. Il existe donc un cycle de méthylation/déméthylation de l'ADN afin de réguler la transcription des gènes. Contrairement à la perte de la méthylation, lors de la réplication de l'ADN, qualifiée de « passive », la déméthylation par les enzymes TET est qualifiée d'« active » (Scourzic et al., 2015).

1.5 Les mi-ARNs ou micro-ARNs

Les microARNs sont des ARNs non codants de 22 nucléotides qui ont pour fonction de réprimer l'expression des gènes. Pour cela, le miARN mature est pris en charge par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui ne conserve qu'un seul brin du miARN. Ce dernier va guider le complexe RISC sur ses ARN messager (ARNm) cibles : d'une part, il peut être complémentaire de la région 3'UTR de l'ARNm cible et dans ce cas s'apparier pour empêcher la traduction de l'ARNm ou d'autre part, il peut entraîner le clivage de l'ARNm cible par le complexe RISC. De plus, les miARNs sont régulés par des mécanismes épigénétiques au même titre que les gènes codants et, en retour régulent l'expression d'effecteurs épigénétiques tels que les gènes codant pour les HDACs et les protéines du groupe Polycomb. Ces derniers font partie d'un groupe spécifique de miARNs nommés les épi-miARNs (Fabbri and Calin, 2010). Dans le cas des Polycomb, la sous-unité catalytique EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2) du complexe PRC2 est responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) au niveau de promoteurs de gènes menant à la répression de ces derniers par la formation d'hétérochromatine. Une étude a montré que le miARN-101

(miR-101) régule l'expression d'EZH2 dans des lignées prostatiques et également dans des échantillons de tumeurs prostatiques humaines. En effet, une surexpression d'EZH2 corrélée à une diminution de l'expression du miR-101 dans les tumeurs a été observée (Varambally et al., 2008). De plus, il a été montré que le miR-101 est capable de se fixer sur le 3'UTR de l'ARNm d'EZH2 pour inhiber son expression (Friedman et al., 2009).

1.6 Quelques exemples de complexes de remodelage de la chromatine

Les protéines responsables des modifications des histones sont souvent retrouvées au sein de complexes macromoléculaires qui jouent spécifiquement un rôle de corépresseur ou de coactivateur transcriptionnel ou les deux à la fois.

1.6.1 Les complexes Polycomb

Les protéines de la famille Polycomb sont conservées de la drosophile jusqu'à l'homme avec une diversification chez l'homme. Ces protéines peuvent être regroupées en deux complexes : PRC1 et PRC2. PRC2 est composé des protéines EZH1 ou EZH2, EED (Embryonic Ectoderm Development), Suz12 (Suppressor of Zeste 12) et RbAp46/RbAp48 (Retinoblastoma Associated proteins 46/48). Les protéines PHC (Polyhomeotic), Bmi1, RING1A/B et CBX forment le complexe PRC1. Ces complexes sont impliqués principalement dans la répression transcriptionnelle en régulant la structure de la chromatine et précisément en modifiant post-traductionnellement les histones.

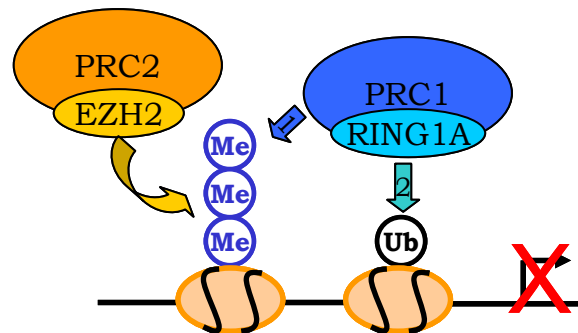


Figure 4 : Mise en place de la répression transcriptionnelle par les complexes Polycomb : EZH2 triméthyle H3K27 (Me3) puis, PRC1 reconnaît H3K27me3 et RING1A ubiquitine H2AK119 (Ub).

Au niveau du gène cible, les complexes PRC sont recrutés séquentiellement : PRC2 est d'abord recruté puis PRC1. En effet, PRC2 est responsable de la diméthylation et triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me2/me3) grâce aux histones méthyltransférases EZH1 ou EZH2. Ensuite, PRC1 reconnaît H3K27me2/me3 et met en place l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub) par les ubiquitines ligases RING1A ou RING1B (Figure 4)(Margueron and Reinberg, 2011).

1.6.2 Les complexes NuRD

Les complexes NuRD sont des complexes multiprotéiques responsables de multiples fonctions au niveau de la régulation transcriptionnelle mais aussi au niveau non transcriptionnel tel que la réparation des dommages à l'ADN. Ces complexes seront décrits en détail dans le chapitre 2.

1.6.3 Le coactivateur P300

La protéine P300, nommée aussi EP300, fut découverte par son interaction avec la protéine adénovirale E1A (Whyte et al., 1989). Aujourd'hui, P300 est qualifiée d'histone acétyltransférase (HAT) capable de remodeler la chromatine et précisément de la « décondenser » afin de permettre la transcription des gènes. En effet, des facteurs de transcription recrutent P300 au niveau du promoteur de leurs gènes cibles afin d'activer leur transcription. Pour cela, d'une part, P300 acétyle plusieurs résidus

lysines des histones H2A, H2B et H3 à proximité du promoteur où elle a été recrutée grâce à son domaine catalytique acétyltransférase (HAT). D'autre part, les domaines de transactivation (TAD) de P300 forment un « pont » entre le complexe d'initiation de la transcription et le facteur de transcription qui l'a recruté au niveau de son gène cible (Wang et al., 2013). De plus, P300 peut s'associer avec d'autres HATs tels que PCAF et GCN5 pour former un complexe coactivateur (Kornacki et al., 2015). Enfin, P300 est capable également d'acétyler des protéines non-histones telles que des facteurs de transcription afin de réguler leur activité. Par exemple, P300 acétyle BCL6 pour inactiver sa fonction de répresseur transcriptionnel dans les cellules B (Bereshchenko et al., 2002).

1.7 Corrélations génétiques et épigénétiques dans le cancer

Aujourd'hui, les altérations épigénétiques observées dans les cancers peuvent être corrélées à des mutations génétiques au niveau de protéines effectrices telle que la déméthylase Tet2 et/ou réceptrices comme l'histone H3 elle-même. Une des altérations épigénétiques les plus étudiées est l'hyperméthylation des promoteurs associée à la répression stable des gènes, c'est-à-dire la méthylation anormale de l'ADN au niveau de promoteurs normalement non méthylés. L'inactivation des enzymes TET2 par des mutations est corrélée à une augmentation de la méthylation de l'ADN dans les leucémies myéloïdes aiguës. Donc, un dérèglement de la déméthylation de l'ADN pourrait expliquer en partie l'hyperméthylation des promoteurs dans les cellules cancéreuses (Baylin and Jones, 2011). Dans les glioblastomes pédiatriques, deux mutations faux-sens ont été identifiées au niveau de l'histone H3 dont celle de la lysine 27 qui est remplacée par une méthionine non méthylable (H3K27M) (Schwartzentruber et al., 2012). De plus, une diminution des niveaux de H3K27me3 est observée dans les tumeurs. En effet, cette mutation inhibe l'activité du complexe PRC2, EZH2 se liant sur la méthionine (H3K27M) mais ne pouvant pas catalyser la triméthylation de la lysine K27 (H3K27me3) (Lewis et al., 2013).

1.8 Thérapies épigénétiques anticancéreuses ou « épidroques »

A ce jour, les protéines contrôlant les modifications épigénétiques sont considérées comme de bonnes cibles pour de nouvelles thérapies anticancéreuses. En effet, contrairement aux mutations génétiques qui sont irréversibles, les aberrations épigénétiques sont réversibles et suscitent donc un grand intérêt pour la recherche de nouveaux traitements anticancéreux. Par exemple, un traitement des cellules de Glioblastome par une combinaison de petites molécules inhibant les désacétylases HDACs et la déméthylase LSD1 induit l'apoptose de ces cellules. En revanche, le traitement de cellules saines avec ce couple d'inhibiteurs n'a aucun effet délétère. Donc, l'utilisation simultanée de deux inhibiteurs ciblant deux acteurs de l'épigénétique semble être une approche thérapeutique prometteuse (Singh et al., 2011). Récemment, de nouvelles stratégies visant à cibler les protéines qui se fixent sur les MPTs des histones telles que les protéines BET (Bromo and Extra-Terminal) sont apparues (Gurard-Levin and Almouzni, 2014). Les protéines BET portent deux bromodomaines (BRD, Bromodomain containing protein) en N-terminal qui leur permettent de se fixer sur les histones acétylées. Dans les cellules cancéreuses, les protéines BET favorisent la prolifération cellulaire en permettant, entre autre, l'expression de gènes anti-apoptotiques. Donc, l'inhibition de ces protéines par des molécules synthétiques semble être une stratégie anti-tumorale adéquate. En effet, le composé PFI-1 mimant une lysine acétylée, se lie aux domaines BRDs des protéines BET présentes dans la cellule afin d'empêcher leur interaction avec les histones acétylées et donc, d'inhiber leur action. Dans des cellules leucémiques, PFI-1 induit un effet antiprolifératif et l'apoptose des cellules (Picaud et al., 2013).

2 Les modifications post-traductionnelles des protéines non-histones

2.1 La SUMOylation

La SUMOylation se définit par la liaison covalente d'une protéine SUMO (Small-Ubiquitin-like Modifier) d'environ 12 kDa sur des résidus lysines. Ces derniers sont compris dans un motif consensus Ψ KxD/E où Ψ est un résidu hydrophobique. Cette modification résulte d'une cascade enzymatique comprenant trois enzymes : un enzyme E1 activateur, un enzyme E2 de conjugaison et un enzyme E3 ligase. Elle peut influencer une interaction avec un partenaire et peut réguler l'activité de la protéine en induisant un changement de conformation (Wilkinson and Henley, 2010). Par exemple, HIC1 est SUMOylé au niveau de la lysine K314 du motif MKHEP localisé dans le domaine central de répression. Cette SUMOylation régule positivement l'activité de répression transcriptionnelle de HIC1 en favorisant l'interaction avec MTA1 (Stankovic-Valentin et al., 2007) (Van Rechem et al., 2010). La SUMOylation étant un mécanisme réversible, la désSUMOylation s'effectue par les enzymes SENP (SENtrin/SUMO specific Protease).

2.2 La phosphorylation

La phosphorylation est la MPT la plus étudiée, elle est caractérisée par l'ajout d'un groupe phosphate sur des résidus acides aminés de type sérine, thréonine ou tyrosine. La réaction est catalysée par une kinase et hydrolysée par une phosphatase (Olsen et al., 2006). Comme les MPTs précédemment décrites, elle permet de réguler l'interaction entre protéines et l'activité transcriptionnelle entre autres. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 2 du facteur de transcription SALL1 par la PKC (Protéine Kinase C) inhibe le recrutement du complexe NuRD perturbant ainsi son activité de répression transcriptionnelle (Lauberth et al., 2007).

2.3 L'acétylation

L'acétylation est l'une des MPTs les plus fréquentes, elle concerne 85% des protéines nucléaires et consiste en l'ajout d'un groupe acétyl sur une lysine par une acétyltransférase HAT. Ce processus est très dynamique et est réversible par l'action d'une histone désacétylase. Cette MPT régule l'interaction avec d'autres protéines, la liaison à l'ADN, la stabilité et l'activité transcriptionnelle de la protéine (Singh et al., 2010). Par exemple, l'acétylation de la lysine K379 de l'oncogène BCL6 et celle de la lysine K314 de HIC1 par l'acétylase P300 inhibent leur activité de répression transcriptionnelle en empêchant le recrutement du complexe NuRD (Bereshchenko et al., 2002; Van Rechem et al., 2010).

2.4 La O-GlcNAcylation

Cette MPT réversible et très dynamique, permet de moduler la fonction de nombreux facteurs de transcription. Elle consiste en l'attachement d'un résidu de N-acétylglucosamine sur des résidus sérine et/ou thréonine par liaison covalente. Elle est contrôlée par un couple d'enzymes : l'O-GlcNAc transférase (OGT) transfère un O-GlcNAc (O-linked N-acetylglucosamine) sur la protéine et la O-GlcNAcase (OGA) hydrolyse le résidu O-GlcNAc (Dehennaut et al., 2014). L'O-GlcNAcylation d'un facteur de transcription peut entrer en compétition avec la phosphorylation du même résidu mais peut aussi réguler d'autres MPTs, la liaison à l'ADN, l'activité transcriptionnelle et la dégradation de la protéine (Hardivillé and Hart, 2014). Par exemple, le produit du gène suppresseur de tumeur *hic1* est O-GlcNAcylé au niveau des doigts de zinc, cette modification ne module pas l'activité de liaison à l'ADN de HIC1 mais, elle est dépendante de la dimérisation de la protéine (Lefebvre et al., 2004).

Toutes ces MPTs jouent donc un rôle très important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires, comme nous l'avons illustré ci-dessus pour des répresseurs transcriptionnels par la modulation du recrutement du complexe NuRD.

3 Le complexe NuRD (Nucleosome and Remodelling Deacetylase)

Le complexe NuRD est l'unique complexe multi-protéique possédant deux activités enzymatiques distinctes : une activité de remodelage des nucléosomes dépendante de l'ATP et une activité de désacétylation des histones (Tong, 1998) (Xue, 1998). Ce complexe est très conservé des plantes aux animaux et est exprimé dans tous les tissus. De plus, dans certains cas, la présence de LSD1 (Lysine-Specific Demethylase 1) au sein du complexe NuRD ajoute une troisième fonction enzymatique (Wang et al., 2009). En effet, LSD1 est une oxydase amine qui catalyse la déméthylation des histones et plus précisément, celle des formes mono- (H3K4me) et diméthylées (H3K4me₂) de la lysine 4 de l'histone H3 (Shi et al., 2004). Mais, une étude biochimique analysant la stœchiométrie du complexe NuRD a montré que LSD1 n'est pas un composant stable du complexe NuRD (Smits et al., 2013).

3.1 Composition du complexe NuRD

Le complexe NuRD est constitué de plusieurs sous-unités protéiques qui peuvent être classées en deux groupes :

- les enzymes comprenant les hélicases/ATPases CHD3/CHD4/CHD5 et les désacétylases HDAC1/2
- les protéines non enzymatiques comprenant les protéines structurales P66 α /P66 β et RbAp46/RbAp48, les protéines MBD2/MBD3 et les protéines MTA1/2/3.

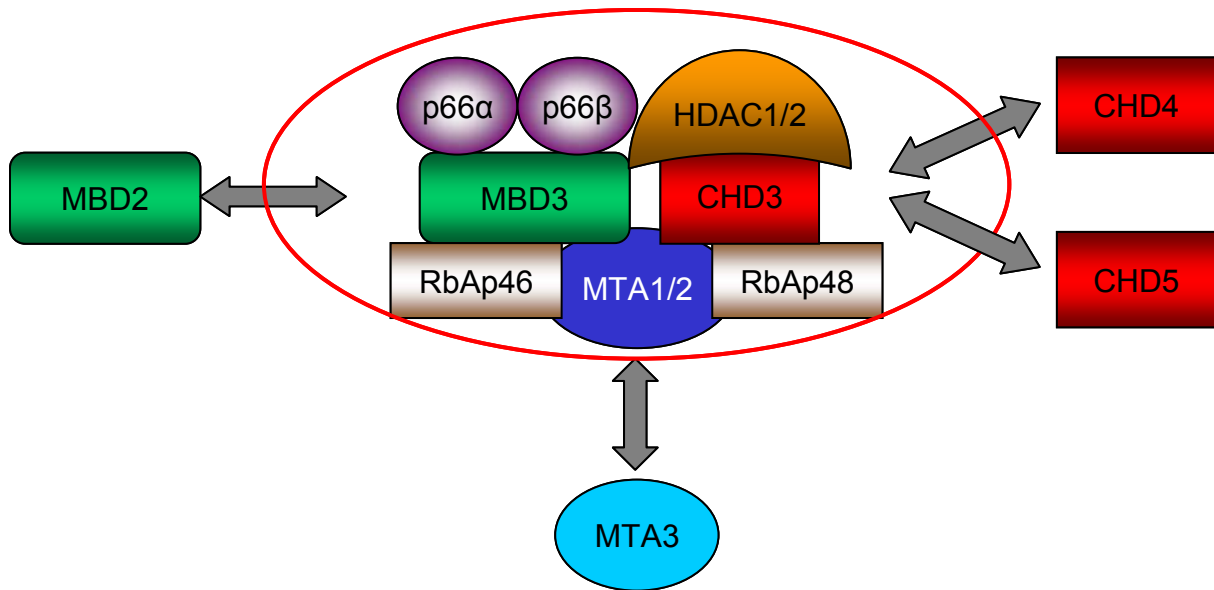


Figure 5 : Représentation schématique du complexe NuRD

Les protéines CHD3/CHD4/CHD5, MBD2/MBD3 et MTA1/2/MTA3 sont mutuellement exclusives au sein du complexe NuRD. Il existe donc plusieurs types de complexes NuRD correspondant à différentes combinaisons de ces sous-unités protéiques (Figure 5) (Allen et al., 2013).

3.1.1 Les ATPases CHD3, CHD4 et CHD5

Les protéines CHD3/CHD4 également connues sous le nom de Mi-2 α/β , sont mutuellement exclusives au sein du complexe NuRD et sont responsables de l'activité de remodelage des nucléosomes. En effet, ce sont des hélicases/ATPases qui hydrolysent l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) comme source d'énergie pour moduler la compaction des nucléosomes. Elles possèdent deux domaines PHD2 (Plant Homeodomain), deux chromodomains (CD) et un domaine hélicase/ATPase en C-terminal (Figure 6) (Tong et al., 1998).

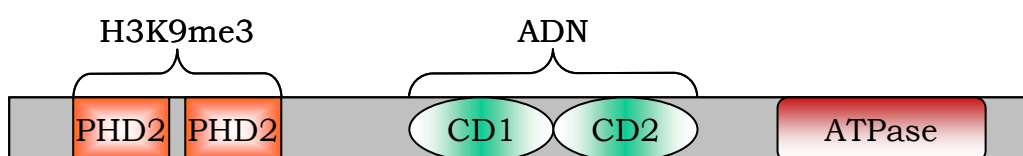










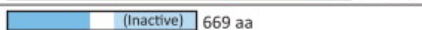









Figure 6 : Structure schématique des protéines CHD3/4/5

Les chromodomaines permettent la liaison avec l'ADN et avec l'histone H3 alors que les domaines PHD ont pour fonction de reconnaître certaines modifications de l'histone H3 afin de s'y fixer (Flanagan et al., 2005; Mansfield et al., 2011). En effet, le domaine PHD2 de CHD4 se lie à la "queue" N-terminale de l'histone H3 en fonction des MPTs de cette dernière : la méthylation de la lysine 9 (H3K9me) favorise l'interaction alors que la méthylation de la lysine 4 (H3K4me) l'inhibe (Mansfield et al., 2011; Musselman et al., 2009). De plus, une étude visant à identifier les rôles de chaque domaine au sein de CHD4, a montré que tous les domaines se régulent les uns les autres. D'une part, les domaines PHD régulent l'activité de liaison à l'ADN des chromodomaines alors que le domaine ATPase et les chromodomaines favorisent l'interaction entre les domaines PHD et l'histone H3. D'autre part, les chromodomaines et les domaines PHD sont nécessaires pour l'activité ATPase de CHD4 (Morra et al., 2012; Watson et al., 2012). Enfin, une troisième ATPase, CHD5, a été identifiée dans un autre complexe NuRD trouvé uniquement dans le cerveau. En effet, chez la souris, CHD5, exprimée spécifiquement dans le système nerveux, est associée à plusieurs sous-unités du complexe NuRD telles que MTA3, P66 β et HDAC1/2 (Potts et al., 2011). Chez l'homme, CHD5 est associée au complexe NuRD dans des lignées cellulaires issues de neuroblastomes humains (Kolla et al., 2015). L'expression préférentielle de CHD5 dans le système nerveux central suggère que ce complexe NuRD joue un rôle important dans le développement du système nerveux et des neuroblastomes (Thompson et al., 2003).

3.1.2 HDAC1/2

Les désacétylases HDAC1/HDAC2 sont responsables de la deuxième fonction enzymatique du complexe NuRD qui est la désacétylation des protéines histones et non-histones. En effet, ces enzymes catalysent l'hydrolyse du groupement acétyl sur les lysines, contrebalançant ainsi l'action des acétyl-transférases (HATs). De plus, au sein du complexe NuRD, ces HDACs interagissent directement avec les protéines CHD3/CHD4 (Tong

et al., 1998). Chez les eucaryotes, il existe quatre classes d'HDACs en fonction de l'homologie de séquence avec les désacétylases de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : classe I pour les HDACs homologues à la protéine RPD3, classe II pour la forte homologie avec les protéines HDA1 et HDA2, classe III pour la similarité avec la protéine SIR2 et classe IV pour HDAC11 ayant une homologie similaire avec RPD3 et HDA1 (Tableau 1) (Shirakawa et al., 2013). HDAC1/2 font partie de la classe I ainsi que HDAC3 et HDAC8 pour leur homologie de séquence avec la protéine *RPD3* et sont exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus humains.

Class	Isoform	Yeast counterpart	Size	Co-factor	Location	Expression	Catalytic domain
(I)	HDAC1	RPD3	58	Zn ⁺⁺	N	Ubiquitous	 482 aa
	HDAC2		59		N		 488 aa
	HDAC3		50		N, C		 428 aa
	HDAC8		44		N		 377 aa
(IIa)	HDAC4	HDA1	120	Zn ⁺⁺	N, C	Specific	 1084 aa
	HDAC5		130		N, C		 1122 aa
	HDAC7		110		N, C		 952 aa
	HDAC9		160		N, C		 1011 aa
(IIb)	HDAC6	HDA2	160	Zn ⁺⁺	N, C	Specific	 1215 aa
	HDAC10		70		N, C		 (Inactive) 669 aa
(III)	SIRT1	Sir2	120	NAD ⁺	N	Variable	 NAD 747 aa
	SIRT2		45		C		 NAD 389 aa
	SIRT3		28		M		 NAD 399 aa
	SIRT4		35		M		 NAD 314 aa
	SIRT5		36		M		 NAD 310 aa
	SIRT6		39		N		 NAD 355 aa
	SIRT7		48		N		 NAD 400 aa
(IV)	HDAC11	RPD3/HDA1	39	Zn ⁺⁺	N	Ubiquitous	 347 aa

TRENDS in Microbiology

Tableau 1 : Classification des HDACs chez les Eucaryotes, les rectangles bleus et rouges représentent le domaine catalytique dépendant des ions Zn⁺⁺ et des ions NAD⁺, respectivement (Shirakawa et al., 2013)

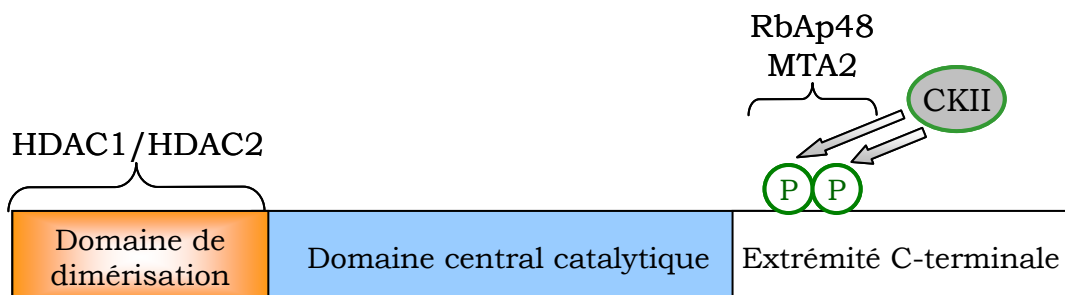


Figure 7 : Structure schématique des désacétylases HDAC1/HDAC2

Les protéines HDAC1 et HDAC2 possèdent 85% d'homologie de séquence et sont structurées en plusieurs parties : un domaine de dimérisation en N-terminal suivi d'un domaine central catalytique de désacétylation et enfin, une région C-terminale régulant et nécessaire pour l'activité catalytique de ces protéines (Figure 7). En effet, de nombreuses MPTs ciblant principalement l'extrémité C-terminale ont été répertoriées telles que la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation ou encore l'ubiquitination en réponse à de nombreux stimuli comme l'hypoxie ou la stimulation hormonale (Segré and Chiocca, 2011). Une étude a montré que la phosphorylation de deux sérines localisées dans la partie C-terminale de HDAC1 par la caséine kinase II (CKII) permet entre autres, l'interaction avec RbAp48 et MTA2 (Pflum et al., 2001). De plus, l'acétylation de HDAC1 diminue directement son activité catalytique mais aussi l'activité de HDAC2 en s'hétérodimérisant avec celle-ci comme au sein du complexe NuRD (Luo et al., 2009).

3.1.3 P66a/ β

Les protéines P66a/ β (GATAD2A/B) sont des sous-unités structurales du complexe NuRD découvertes chez le Xénope (Wade et al., 1999). Puis, elles ont été identifiées chez l'homme comme interagissant avec MBD2 et MBD3 (Brackertz et al., 2002).

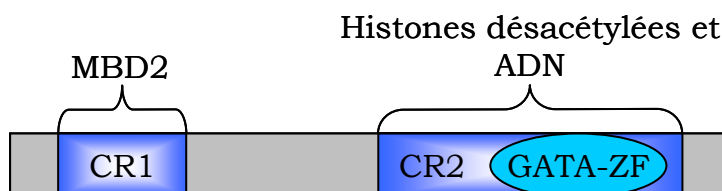


Figure 8 : Structure schématique des protéines P66a/ β

Elles possèdent deux régions conservées : CR1 correspondant au domaine « super-enroulé » N-terminal et CR2 correspondant au domaine C-terminal en doigts de zinc de type GATA-ZF (Figure 8). D'une part, le

domaine CR1 interagit avec MBD2 pour former un complexe hétérodimérique et d'autre part, le domaine CR2 interagit avec les histones non-acétylées (Brackertz et al., 2006; Gnanapragasam et al., 2011). La fonction répressive de MBD2 dépend de la présence simultanée des deux protéines P66 au sein du complexe NuRD (Brackertz et al., 2006). De plus, une autre étude a permis d'identifier deux sites de SUMOylation au sein des protéines P66. La SUMOylation favorise le pouvoir répresseur de ces protéines et l'interaction avec les autres sous-unités du complexe NuRD : RbAp46 et HDAC1 mais, n'influence pas l'interaction avec MBD2 (Gong et al., 2006). Enfin, un modèle de souris invalidées pour le gène *P66α* (*P66α* *-/-*) indique une létalité embryonnaire précoce (jour 9,5) comme pour les souris *DNMT1* *-/-*. En effet, ces embryons murins présentent d'importantes anomalies du développement dues au défaut de méthylation de l'ADN mis en place très tôt dans le développement (Lei et al., 1996). Ces résultats suggèrent que les protéines P66 seraient importantes pour le maintien et la mise en place de la méthylation de l'ADN afin de réprimer la transcription de gènes donnés (Marino and Nusse, 2007).

3.1.4 RbAp46/RbAp48

Les protéines RbAp46 (Retinoblastoma Associated Protein p46) et RbAp48, nommées aussi RBBP7 et RBBP4, ont d'abord été identifiées comme interagissant avec la protéine Rb (Retinoblastoma) (Qian et al., 1993). Par la suite, elles ont été considérées comme des « chaperonnes d'histones » jouant un rôle dans le maintien de la structure chromatinienne en partie grâce à leur interaction avec l'extrémité N-terminale des histones H4.

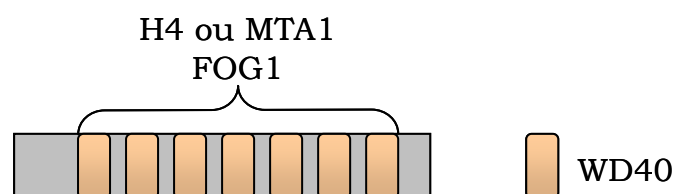


Figure 9 : Schéma des protéines RbAp46/RbAp48

Au niveau de leur structure, elles possèdent plusieurs régions de 40 répétitions Tryptophane-Acide aspartique (WD40) leur permettant l'interaction avec l'histone H4 (Figure 9) (Murzina et al., 2008). Aujourd'hui, elles ont été associées à plusieurs complexes multiprotéiques tels que le complexe Polycomb PRC2 et le complexe NuRD (Allen et al., 2013). Au sein de ce dernier complexe, ce sont des protéines structurales (Denslow and Wade, 2007). De plus, RbAp48 peut également interagir avec le co-facteur FOG1 (Friend Of GATA) qui lui-même interagit avec MTA1 (Lejon et al., 2011; Roche et al., 2008). Récemment, une étude a montré que RbAp48 interagit aussi avec MTA1 par la même région utilisée pour l'interaction avec l'histone H4. De plus, l'interaction entre RbAp48 et MTA1 est nécessaire pour la formation du complexe NuRD et empêche RbAp48 d'interagir avec l'histone H4 (Alqarni et al., 2014).

3.1.5 MBD2/MBD3

Les sous-unités MBD2/3, également présentes de façon mutuellement exclusive, sont les plus petites protéines du complexe NuRD. MBD2 et MBD3 appartiennent à la famille des protéines possédant un domaine MBD (Methyl cytosine-guanosine-Binding Domain) qui, uniquement dans le cas de MBD2, leur permet de reconnaître les dinucléotides CpG méthylés de l'ADN et de s'y lier (Le Guezennec et al., 2006).

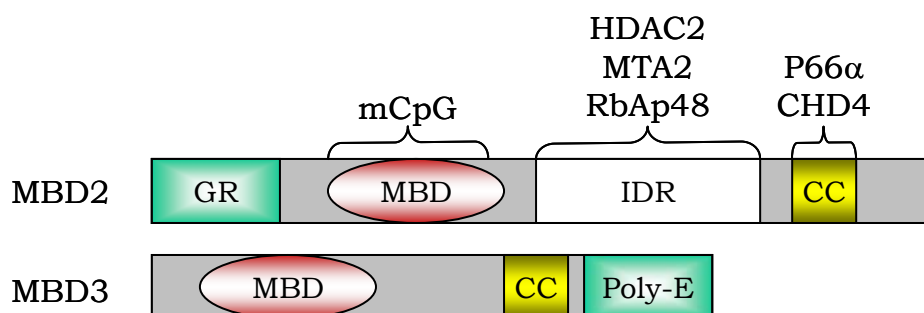


Figure 10 : Structure schématique des protéines MBD2 et MBD3

Précisément, MBD2 possède un domaine N-terminal constitué de répétitions glycine-arginine (GR), suivi du domaine MBD puis d'une région

désordonnée (Intrinsically disorder region, IDR) et enfin d'un motif C-terminal « coiled-coil »(CC) (Figure 10) (Torchy et al., 2015). Récemment, il a été montré que le domaine IDR de MBD2 interagit avec les protéines HDAC2, MTA2, et RbAp48 pour recruter le complexe NuRD au niveau de l'ADN méthylé (Desai et al., 2015). De plus, précédemment, cette même équipe avait défini le motif C-terminal de MBD2 comme interagissant avec P66 α pour recruter CHD4 (Gnanapragasam et al., 2011). Ce mécanisme est nécessaire pour inhiber l'expression du gène de la β -globine fœtale dans les cellules érythroïdes humaines (Amaya et al., 2013). Donc, MBD3 jouerait le rôle de « plateforme » d'interactions pour la formation du complexe NuRD au niveau du gène ciblé. Contrairement à MBD2, MBD3 possède un domaine MBD suivi d'une région « coiled coil »(CC) et d'un motif C-terminal poly-glutamate (poly-E) (Figure 10) (Torchy et al., 2015). Une très belle étude a montré que MBD3 était nécessaire pour la formation stable du complexe NuRD afin de réguler la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ES). En effet, dans des cellules ES murines où le gène MBD3 a été inactivé, les sous-unités MTA1, MTA2 et RbAp46 s'expriment moins et n'interagissent plus entre elles pour former le complexe NuRD (Kaji et al., 2007). De plus, il a été récemment montré que la formation des complexes MBD3-NuRD favorise la reprogrammation des cellules vers un état de pluripotence (Rais et al., 2013; dos Santos et al., 2014). Mais, cette étude est très controversée car elle est en contradiction avec deux études précédentes montrant que l'inhibition de l'expression de MBD3 dans des fibroblastes humains induit leur reprogrammation en cellules souches induites (iPS) avec une efficacité de 100% (Luo et al., 2013; Rais et al., 2013). Donc, le rôle des complexes MBD3-NuRD dans la reprogrammation des cellules vers un état de pluripotence n'est pas tout à fait élucidé.

En ce qui concerne les protéines MTA, elles feront spécifiquement l'objet du chapitre 4.

3.2 Rôles du complexe NuRD

3.2.1 Longtemps qualifié comme répresseur transcriptionnel...

Lorsque le complexe NuRD fut découvert, il fut considéré comme jouant un rôle dans la répression transcriptionnelle grâce à deux mécanismes : soit, en étant recruté directement par un répresseur transcriptionnel tel que Ikaros dans les lymphocytes, soit en se fixant à l'ADN méthylé grâce à MBD2 (Tyler and Kadonaga, 1999). Aujourd'hui, de nombreuses études montrent que ce complexe est recruté par des facteurs de transcription au niveau de leurs gènes cibles afin de réprimer la transcription. De nombreuses protéines codées par des gènes suppresseurs de tumeurs ou par des oncogènes recrutent le complexe NuRD telles que :

- L'oncogène *BCL6* (B-Cell Lymphoma 6) code un facteur de transcription impliqué dans le développement des cellules B du centre germinatif. Afin de réprimer les gènes de différenciation plasmocytaire tels que *PRDM1*, *BCL6* interagit avec *MTA3* pour recruter les complexes NuRD (Fujita et al., 2003; Parekh et al., 2007). *BCL6* joue un rôle important dans le développement des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL) (Kusam and Dent, 2007).
- Le facteur de transcription *BCL11B* (B-Cell leukemia 11 B) recrute NuRD pour réprimer la transcription du VIH dans les lymphocytes T (Cismasiu et al., 2008).
- Le gène suppresseur de tumeurs *HIC1* (Hypermethylated In Cancer 1) codant pour un répresseur transcriptionnel recrute le complexe NuRD au niveau de ses gènes cibles tels que la *cycline D1* et *p57KIP2* pour réprimer leur transcription (Van Rechem et al., 2010).

3.2.2 Puis reconnu également activateur transcriptionnel ...

Mais, certaines sous-unités de ce complexe telles que l'ATPase Mi-2 α et *MTA1*, ont également une fonction activatrice de la transcription,

respectivement, au niveau des gènes cibles de la protéine c-Myb et du gène *BCAS3* (Breast Cancer Amplified Sequence 3) lorsqu'elles sont recrutées par d'autres facteurs de transcription (Gururaj et al., 2006; Saether et al., 2007; Streubel et al., 2013).

Toutefois, des études ont montré que le complexe NuRD lui-même, peut activer la transcription. La première étude décrivant ce phénomène indique que le complexe NuRD est recruté pour l'activation dépendante de FOG1 de certains gènes cibles hématopoïétiques du facteur de transcription GATA dans les cellules érythroïdes (Miccio, 2010). Or, précédemment, il a été montré que GATA réprime la transcription d'une partie de ses gènes cibles en recrutant également le complexe NuRD via FOG1 (Hong et al., 2005). En revanche, le mécanisme expliquant comment le complexe NuRD peut réprimer ou activer la transcription au niveau de tel ou tel gène cible de GATA/FOG1 n'a pas encore été élucidé. Plus tard, un autre facteur de transcription a été décrit comme activant la transcription de ses gènes cibles en recrutant le complexe NuRD. Précisément, lors de la différenciation lymphocytaire, le facteur de transcription Ikaros régule l'activité du complexe NuRD en le recrutant au niveau de ses gènes cibles afin de favoriser la reprise de l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II et donc d'activer la transcription (Zhang et al., 2012a). Récemment, il a été montré que le complexe NuRD associé au facteur d'élongation PTEFb est recruté au niveau des gènes cibles d'Ikaros dans les cellules hématopoïétiques. Dans cette étude, le complexe NuRD faciliterait le passage de l'ARN polymérase II en déstabilisant puis remodelant la chromatine lors de l'élongation de la transcription (Bottardi et al., 2014).

3.2.3 Et aussi régulateur d'autres complexes protéiques...

Dans les cellules souches embryonnaires (ES), un certain nombre de gènes sont caractérisés par la présence simultanée de deux modifications d'histones qui ont des fonctions opposées. En effet, les promoteurs de ces gènes, nommés bivalents, portent deux modifications épigénétiques au niveau de l'histone H3 sur deux résidus différents : H3K4me3, associée aux

gènes actifs et H3K27me3 qui est une marque répressive (Bernstein et al., 2006). Ces gènes bivalents ne sont pas exprimés dans les cellules ES mais sont considérés dans un état «de pause» afin de pouvoir être rapidement activés lors de la différenciation.

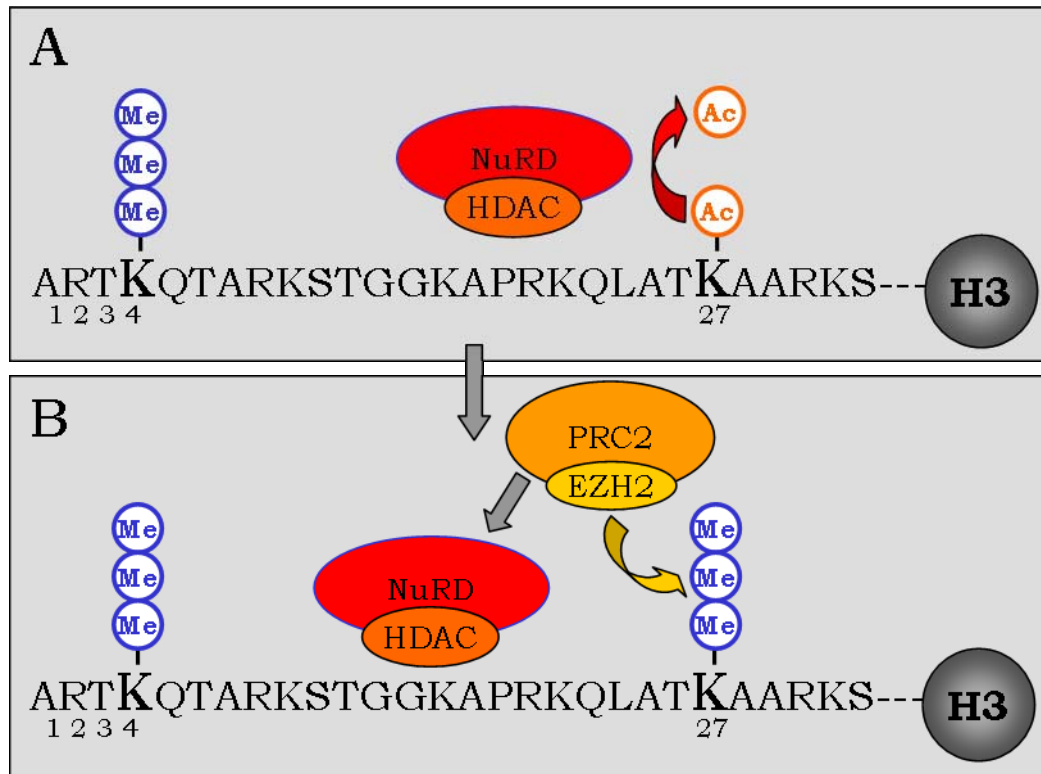


Figure 11 : Coopération entre les complexes NuRD et PRC2 pour la mise en place des gènes bivalents dans les cellules souches embryonnaires

Une étude très élégante a montré que le complexe NuRD, localisé au niveau de ces gènes bivalents, joue un rôle important dans la mise en place de la marque épigénétique H3K27me3 en recrutant le complexe Polycomb PRC2. En effet, le complexe NuRD désacétyle H3K27 (Figure 11A) afin que EZH2, la sous-unité catalytique du PRC2 puisse la trimétyler (Figure 11B) (Reynolds et al., 2012). Donc, dans ce modèle, le complexe NuRD régule la balance entre l'acétylation et la méthylation de H3K27 au niveau des gènes bivalents.

3.2.4 Mais, jouant aussi des rôles non transcriptionnels.

Outre son rôle principal de régulateur transcriptionnel, NuRD module également les défauts de la chromatine liés au vieillissement et, régule la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN (Pegoraro, 2009) (Smeenk, 2010). Ces fonctions diverses sont réalisées par les sous-unités du complexe NuRD. En effet, MTA1 et CHD4 sont recrutés par la PolyADP Ribose Polymérase (PARP) au niveau des sites de dommages à l'ADN. Les auteurs proposent que PARP recrutent ces protéines afin de maintenir la chromatine dans un état répressif pour bloquer la transcription et permettre la réparation de l'ADN (Chou et al., 2010; Polo et al., 2010).

Le complexe NuRD joue également un rôle important dans l'assemblage et le maintien de structures des chromosomes. Dans les lymphocytes B qui prolifèrent rapidement, les complexes NuRD s'associent aux régions péricentrométriques des chromosomes 1, 9 et 16 lors de la phase S. Ces structures, nommées « NuRD bodies », se forment juste après la réplication de l'ADN et jouent un rôle dans l'assemblage de l'hétérochromatine (Helbling Chadwick et al., 2009). De plus, l'inhibition de l'expression de CHD4 empêche la formation des « NuRD bodies » lors de la phase S et induit donc un défaut d'assemblage de l'hétérochromatine au niveau des centromères (Sims and Wade, 2011).

Enfin, le complexe NuRD régule également la transition G1/S du cycle cellulaire. De manière plus précise, CHD4 contrôle la transition G1/S en régulant la désacétylation de P53 : lors de dommages à l'ADN importants, le complexe CHD4-NuRD désacétyle P53 pour le stabiliser afin d'activer l'expression de P21 et induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Polo et al., 2010).

En résumé, le rôle du complexe NuRD ne se limite pas uniquement à la régulation des gènes. Mais, au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à son rôle de corépresseur recruté par des facteurs de transcription qu'il peut assurer, en partie, grâce aux protéines MTA1,2 et 3. Les protéines MTA seront donc décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

4 Les protéines MTA1/2/3

4.1 Découverte

4.1.1 MTA1, le fondateur de la trilogie

Lors d'une étude visant à identifier de nouveaux gènes-candidats associés aux métastases dans un modèle d'adénocarcinomes mammaires de rat, le gène *mta1* a été découvert comme étant surexprimé dans des lignées métastatiques (Toh et al., 1994). Peu de temps après, son homologue humain *MTA1* a été étudié et ce dernier est également surexprimé dans des lignées cancéreuses humaines (Toh et al., 1995). La protéine MTA1 (Metastasis-associated gene 1) est alors associée aux métastases.

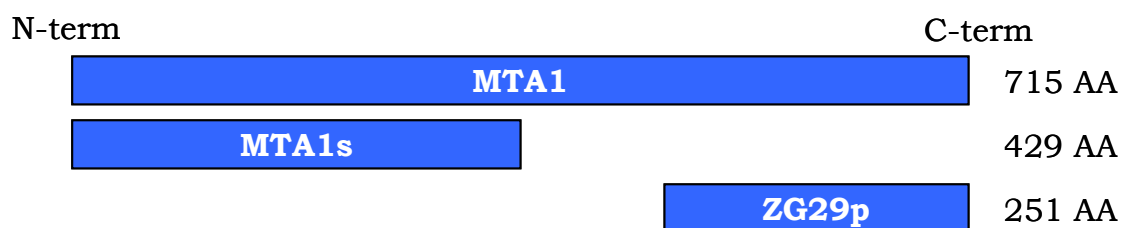


Figure 12 : Schémas de MTA1 et de ses deux variants : MTA1s et ZG29p

Elle est constituée de 715 acides aminés (AA) pour un poids moléculaire de 80 Kda (Toh and Nicolson, 2014a). Deux isoformes de MTA1 ont également été identifiées : MTA1s et ZG29p. MTA1s (429 AA) correspond à une protéine MTA1 clivée en C-terminal et possède un domaine de liaison au récepteur à l'œstrogène (ER) permettant sa séquestration dans le cytoplasme (Kumar et al., 2002). Par contre, ZG29p (251 AA) correspond à une protéine MTA1 clivée en N-terminal et est exprimée spécifiquement dans les grains de zymogène des cellules du pancréas (Figure 12) (Liu et al., 2003).

4.1.2 MTA2 et MTA3

Par la suite, deux protéines homologues à MTA1 ont été identifiées : MTA2 (668 AA) et MTA3 (515 AA) (Figure 13) (Simpson et al., 2001; Zhang et al., 1999). Elles possèdent 68,2 et 73,2% d'homologie de séquence avec MTA1, respectivement.

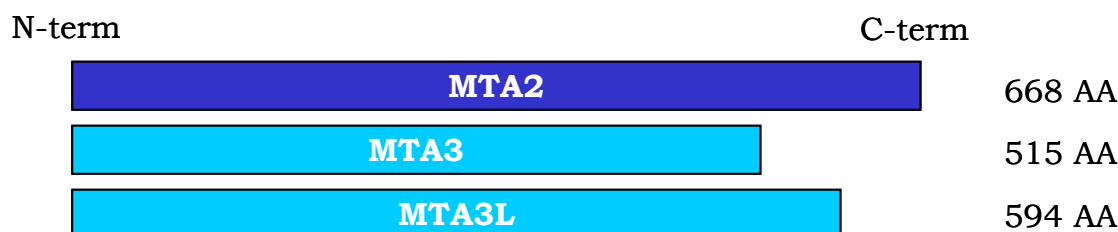


Figure 13 : Schémas de MTA2, MTA3 et son variant MTA3L

Aujourd'hui, il existe également une isoforme de MTA3: MTA3L (594 AA) qui correspond à la forme longue de MTA3 (Figure 13) (Liu et al., 2014).

4.1.3 Expression des protéines MTA et leur régulation

Chez l'homme, MTA1 et MTA2 sont exprimées de façon ubiquitaire avec une expression plus forte dans les testicules, le cerveau, le foie et les reins alors que MTA3 est exprimée uniquement au niveau des lymphocytes B et des cellules cancéreuses du sein (Manavathi et al., 2007).

Peu d'informations sont connues sur la régulation de l'expression des protéines MTA. Cependant, il a été montré que *mta1* est un gène cible de C-myc dans des fibroblastes primaires de derme humain (Zhang et al., 2005). De plus, le miARN-661 inhibe l'expression de MTA1 (Reddy et al., 2009). Dans les cancers humains, la surexpression de MTA1 peut s'expliquer par le fait que MTA1 soit une protéine de réponse aux stress (Wang, 2014). En effet, MTA1 est surexprimée en cas d'hypoxie et d'irradiations (Li et al., 2009a; Yoo et al., 2006). En ce qui concerne MTA3, la présence d'un demi-site correspondant à un élément de réponse au récepteur aux œstrogènes (ERE) dans son promoteur est suffisante pour la régulation positive de son expression par ER dans les cellules cancéreuses du sein (Fujita et al., 2004a).

La fonction majeure de cette famille de protéines est exercée à travers le complexe NuRD où elles agissent principalement en tant que corépresseur (Toh, 2009). De par leur structure, les protéines MTA permettent l'assemblage du complexe NuRD et le recrutement de ce dernier par des facteurs de transcription.

4.1.4 Structure des protéines MTA

Ces protéines sont structurées en deux parties : une région N-terminale conservée parmi les protéines MTAs et une région C-terminale distincte.

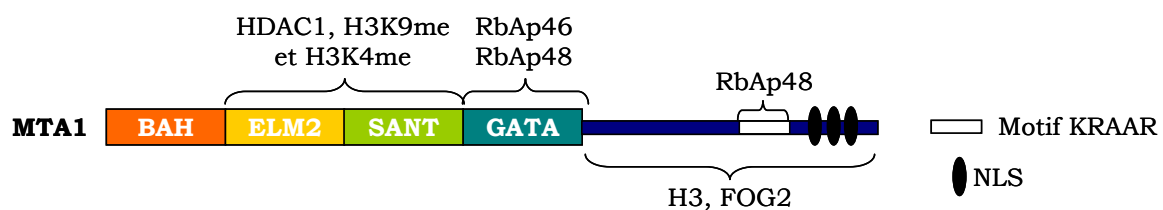


Figure 14 : Structure schématique représentant MTA1

La région N-terminale correspondant aux 420 premiers résidus, est constituée de quatre domaines fonctionnels : à l'extrémité, le domaine BAH (Bromo-Adjacent-Homology) impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines dont les sous-unités du complexe NuRD, puis, le domaine ELM2 (Egl-27 and MTA1 homology 2) sans fonction définie, suivi du domaine SANT (SWI/ADA2/NCoR/TFIIIB) interagissant avec les histones, et d'un motif en doigt de zinc de type GATA interagissant avec RbAp46 et RbAp48. Cette région N-terminale est impliquée dans l'interaction avec le complexe NuRD et avec certaines MPTs de l'histone H3. De plus, une étude récente a montré que les domaines ELM2-SANT de MTA1 sont nécessaires à l'interaction avec HDAC1, ces domaines « s'enroulent » autour du domaine catalytique de HDAC1 (Alqarni et al., 2014). Ces mêmes domaines sont également impliqués dans la reconnaissance de deux MPTS de l'histone H3 : les lysines 4 et 9 méthylées (H3K4me, H3K9me) (Figure 14) (Nair et al., 2013).

Quant à la région C-terminale, elle ne possède aucun domaine fonctionnel et est complètement désorganisée (Millard et al., 2014). Toutefois, l'extrémité C-terminale de MTA1 contient trois séquences

putatives de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un motif peptidique de séquence KRAARR (Figure 14). Récemment, il a été montré que ce motif interagissait avec RbAp48 (cf 3.1.4)(Alqarni et al., 2014). De plus, cette extrémité C-terminale est également impliquée dans l'interaction avec des régulateurs transcriptionnels tels que FOG2 mais aussi avec l'histone H3 (Roche et al., 2008; Wu et al., 2013). Enfin, elle est sujette à des MPTs telles que la SUMOylation, l'acétylation et la méthylation qui vont réguler ses rôles transcriptionnels (cf 4.5) (Cong et al., 2011; Gururaj et al., 2006; Nair et al., 2013).

4.1.5 Localisation subcellulaire des protéines MTA

La protéine MTA1 possède trois NLS dans sa région C-terminale ce qui indique qu'elle serait préférentiellement localisée dans le noyau (Nicolson et al., 2003). Mais, récemment, une étude a décrit plusieurs localisations de MTA1 au sein de la cellule : MTA1 est localisée dans le noyau, dans le cytoplasme et au niveau de l'enveloppe nucléaire. De plus, MTA1 cytoplasmique est localisée au niveau des microtubules (Liu et al., 2014). L'association de MTA1 avec les microtubules conforte l'étude montrant que MTA1 interagit avec la protéine cytoplasmique Endophiline 3, ce qui suggère un rôle de MTA1 dans la régulation de l'endocytose (Aramaki et al., 2005).

En résumé, MTA1 est localisée soit majoritairement dans le noyau, soit majoritairement dans le cytoplasme ou co-localisée dans les deux compartiments cellulaires. De plus, le passage d'une localisation cytoplasmique à nucléaire et inversement est un processus dynamique au sein d'une cellule. En effet, il existe une régulation de la distribution subcellulaire de MTA1 entre le noyau et le cytoplasme au cours des différentes phases du cycle cellulaire : à l'interphase, MTA1 est plutôt localisée dans le noyau puis en prophase, MTA1 se dissocie de la chromatine et est transloquée dans le cytoplasme et en télophase, MTA1 rejoint le noyau au niveau des chromosomes décondensés (Liu et al., 2015).

En ce qui concerne les protéines MTA2 et MTA3, des études ont montré qu'elles sont localisées dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules (Liu

et al., 2012; Simpson et al., 2001). En revanche, la fonction des protéines MTA2 et MTA3 cytoplasmiques est aujourd'hui encore totalement inconnue.

Dans la cellule, la localisation subcellulaire d'une protéine est fortement corrélée aux fonctions moléculaires qu'elle exerce. La fonction majeure de la famille des protéines MTA est exercée à travers le complexe NuRD où elles agissent principalement en tant que corépresseurs (Toh and Nicolson, 2009). Cette fonction est donc associée aux protéines MTAs nucléaires de même que sa participation plus générale dans des complexes de désacétylation.

4.2 Rôles des protéines MTAs dépendants du complexe NuRD

Les protéines MTA permettent de distinguer trois complexes NuRD qui ciblent des promoteurs différents et définissent des fonctions spécialisées (Toh and Nicolson, 2009). Au sein du complexe NuRD, les protéines MTA agissent en tant que plateforme d'interactions entre les différentes sous-unités protéiques permettant ainsi la formation du complexe. En effet, MTA1 interagit avec HDAC1 d'une part, et avec RbAp48 d'autre part, permettant ainsi la formation d'un complexe entre HDAC1 et RbAp48 (Alqarni et al., 2014; Millard et al., 2013). De plus, MTA1 permet également la liaison du complexe NuRD à la chromatine, l'extrémité C-terminale interagissant directement avec l'histone H3 (Nair et al., 2013; Wu et al., 2013).

Comme décrit précédemment, le complexe NuRD est principalement un complexe corépresseur et les protéines MTA permettent de recruter ce complexe au niveau de nombreux gènes pour réprimer leur transcription. En effet, le complexe MTA1-NuRD réprime la transcription du gène suppresseur de tumeur *BRCA1*, premier gène de susceptibilité aux cancers du sein et de l'ovaire (Molli et al., 2008). La répression de *BRCA1* induit un nombre anormal de centrosomes et une instabilité chromosomique qui sont liés à la tumorigénèse. Ensuite, le complexe NuRD contenant MTA1 ou MTA2 réprime la transcription du récepteur à œstrogène (ER) dans les cellules cancéreuses humaines du sein. L'inhibition de ER induit la croissance

oestrogéno-indépendante des cellules cancéreuses humaines du sein (Cui et al., 2006; Mazumdar et al., 2001). De plus, ces deux complexes sont également impliqués dans la régulation post-traductionnelle de la protéine P53 : la liaison du complexe à P53 induit sa désacétylation ce qui provoque sa dégradation, aboutissant donc à l'inhibition de l'apoptose (Moon et al., 2007). Donc, MTA1 et MTA2 semblent exercer des fonctions similaires au sein du complexe NuRD et sont fortement impliquées dans la tumorigénèse.

En ce qui concerne le complexe MTA3-NuRD, il est également impliqué dans la régulation d'ER. En effet, ER induit l'expression de MTA3 qui à son tour réprime le gène *snail* qui régule la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'inhibition de l'expression de *snail* permet de maintenir un phénotype différencié des cellules humaines du sein et empêche l'EMT (Fujita et al., 2003, 2004a). De plus, le complexe MTA3-NuRD réprime également le gène *wnt4* dans les cellules mammaires ce qui conduit à l'inhibition de la différenciation et de la prolifération des cellules (Zhang et al., 2006). Le rôle de MTA3 est donc opposé à celui de MTA1 et de MTA2 dans la tumorigénèse des cellules épithéliales mammaires.

4.3 Rôles des protéines MTAs indépendants du complexe NuRD

Mais, les protéines MTAs semblent également remplir d'autres fonctions en dehors du complexe NuRD.

De nombreuses études ont montré que MTA1 coactive la transcription de nombreux gènes tels que *BCAS3* (Breast Cancer Amplified Sequence 3) et *STAT3* grâce à la formation d'un complexe MTA1-ARN Pol II (Gururaj et al., 2006; Pakala et al., 2013). En effet, la forme acétylée de MTA1 possède des fonctions coactivatrices : l'acétyltransférase P300 acétyle MTA1 sur la lysine 626 qui peut alors recruter l'ARN polymérase II pour induire l'expression du gène *BCAS3* dans les cellules cancéreuses mammaires humaines. Mais, aujourd'hui, ce mécanisme n'est pas encore clairement défini. En revanche, une étude récente a montré que la méthylation de la lysine 532 de MTA1 régule son interaction avec le complexe corépresseur NuRD ou avec le

complexe coactivateur NURF (Nucleosome Remodelling Factor). En effet, la méthylation de MTA1 par la méthyltransférase G9a favorise son assemblage avec le complexe NuRD au niveau des gènes cibles tandis que la déméthylation par LSD1 recrute le complexe NURF (Nair et al., 2013). Ce modèle dynamique suggère donc un double rôle de MTA1 dans la régulation de la transcription de gènes : corépresseur et coactivateur en fonction des MPTs de ce dernier. Les MPTs de MTA1 régulant ses fonctions seront détaillées au paragraphe 4.5. et dans la Figure 15.

Toutefois, MTA1 connaît également d'autres rôles dans la régulation de protéines. En effet, MTA1 stabilise HIF1 alpha en recrutant HDAC1 qui désacétyle HIF1 alpha et empêche donc sa dégradation (Yoo et al., 2006). De plus, MTA1 semble également jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR, DNA Damage Response). Par exemple, MTA1 stabilise P53 de façon indirecte lors de dommages à l'ADN. En effet, MTA1 inhibe les E3 ligases COP1 et mdm2 qui sont responsables de l'ubiquitination de P53 et donc de sa dégradation (Li et al., 2009a). De plus, l'induction de dommages à l'ADN par des irradiations stabilise MTA1, elle-même. En effet, la dégradation de MTA1 est inhibée en empêchant l'E3 ligase COP1 de l'ubiquitinyler (Li et al., 2009b). De même qu'en réponse aux dommages à l'ADN induits par des UV, MTA1 est stabilisée par la voie ATR (Li et al., 2010a). De plus, MTA1 module également l'expression de *P21* indépendamment de P53 dans la réponse aux dommages à l'ADN (Li et al., 2010b). En ce qui concerne MTA2, une étude a montré l'accumulation de MTA2 aux sites de cassures de l'ADN pour favoriser la réparation (Smeenk et al., 2010). En revanche, l'inhibition de l'expression de MTA3 ne sensibilise pas les cellules aux irradiations ne suggérant pas de fonction de MTA3 dans la réponse aux dommages à l'ADN (Ayrappetov et al., 2011).

Finalement, au niveau des rôles dépendants et indépendants du complexe NuRD, les protéines MTA1 et MTA2 ont des fonctions similaires qui semblent être à l'opposé des fonctions de MTA3.

4.4 Rôles des deux isoformes de MTA1 : MTA1s et ZG29p

4.4.1 MTA1s : « Petit mais costaud »

En ce qui concerne le variant court de MTA1, MTA1s, il est localisé majoritairement dans le cytoplasme de la cellule dû à la perte des NLS après épissage alternatif. En effet, MTA1s correspond à la région N-terminale de MTA1 (AA 1-429, cf Figure 12). Dans le cytoplasme, il inhibe l'activité du récepteur à l'œstrogène (ER) en le séquestrant grâce à son domaine de liaison spécifique pour ER. MTA1s empêche donc le passage d'ER dans le noyau ce qui inhibe l'activation des voies de signalisation en réponse à l'activation d'ER dans le noyau (Kumar et al., 2002). De plus, MTA1s s'associe avec la caséine kinase I-gamma 2 (CKI-gamma 2) dans le cytoplasme en réponse à l'œstrogène. Précisément, lors d'une stimulation à l'œstrogène, CKI-gamma 2 est activée pour phosphoryler MTA1s qui ne peut plus séquestrer ER dans le cytoplasme (Mishra et al., 2004). Cependant, deux études ont montré que MTA1s est également localisée dans le noyau où il participe de façon indirecte à l'activation de la voie Wnt1 au cours du développement de la glande mammaire et de la tumorigénèse de celle-ci. En effet, MTA1s interagit avec le corépresseur Six3 pour empêcher son action de répression transcriptionnelle de la voie Wnt1 et donc, favoriser l'activation de la voie Wnt1 dans les cellules épithéliales et cancéreuses mammaires (Kumar et al., 2010a, 2010b).

4.4.2 MTA1-ZG29p : un variant protéique spécifique du pancréas

Le variant ZG29p de MTA1 est spécifiquement exprimé dans le pancréas et correspond aux 250 AA C-terminaux de MTA1 (cf Figure 12). Même si cette isoforme possède les deux NLS de MTA1, elle n'est pas localisée dans le noyau mais est présente dans les grains de zymogène des cellules du pancréas (Kleene et al., 1999). Le rôle de cette isoforme est inconnu jusqu'à aujourd'hui. En revanche, ZG29p interagit avec l'amylase par ses domaines SH3 ce qui lui confère un rôle dans la formation des grains de zymogène du pancréas (Kleene et al., 2000).

4.5 Régulation des protéines MTAs par des MPTs

Comme évoqué précédemment, MTA1 peut être acétylée par P300 et/ou méthylée/déméthylée par respectivement les enzymes G9a/LSD1 pour réguler sa fonction de corépresseur ou coactivateur transcriptionnel (cf 4.5). De plus, MTA1 peut également être SUMOylée et ubiquitinylée (Figure 15).

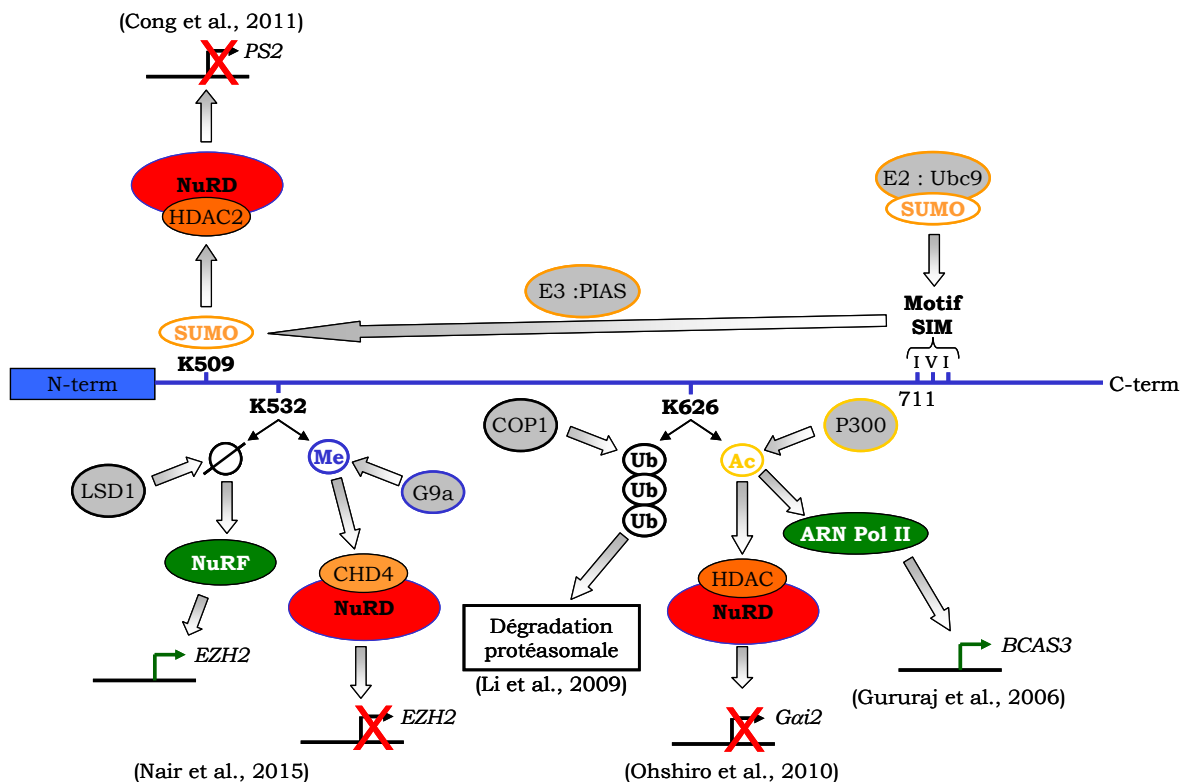


Figure 15 : Schémas récapitulatif des MPTs régulant MTA1

Toutes ces MPTs sont localisées au sein de l'extrémité C-terminale de MTA1 qui est aussi la région interagissant avec des facteurs de transcription pour recruter le complexe NuRD au niveau de leurs gènes cibles.

4.5.1 Les rôles opposés de l'acétylation de MTA1

Précisément, l'acétylation de MTA1 sur la lysine 626 (K626) par P300 est la seule MPT capable de favoriser à la fois son rôle de corépresseur et de coactivateur en fonction du gène cible. Dans les cellules mammaires

cancéreuses, l'acétylation de MTA1 promeut le recrutement de l'ARN pol II au niveau du gène *BCAS3* pour activer la transcription (Gururaj et al., 2006). En revanche, dans les fibroblastes primaires de rat, l'acétylation de MTA1 favorise le recrutement du complexe HDAC/NuRD au niveau du gène *Gai2* pour inhiber la transcription (Figure 15) (Ohshiro et al., 2010). Toutefois, le mécanisme permettant le recrutement de MTA1 acétylée pour coactiver ou coréprimer la transcription selon le gène cible n'est pas encore compris.

4.5.2 La SUMOylation et le motif SIM de MTA1

La SUMOylation de MTA1 promeut son rôle de corépresseur au niveau du gène *PS2*. En effet, MTA1 SUMOylée recrute le complexe NuRD, via HDAC2, au niveau du promoteur de *PS2* pour réprimer la transcription. Pour cela, MTA1 possède un motif SIM (SUMO-Interacting Motif) dans l'extrémité C-terminale qui permet la SUMOylation d'une lysine située en amont de ce SIM. Précisément, l'enzyme E2 de conjugaison, Ubc9 (Ubiquitin-like protein SUMO1 conjugating protein), liée à une protéine SUMO2 se fixe au niveau du motif SIM de MTA1. Puis, l'enzyme E3 ligase, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT), lie de manière covalente la protéine SUMO2 sur la lysine 509 (K509) de MTA1 (Figure 15). Le motif SIM d'une protéine permet aussi d'interagir avec des protéines SUMOylées. De plus, MTA1 régule également sa SUMOylation en activant directement le gène *SUMO2* avec l'ARN pol II et SP1 (Cong et al., 2011).

4.5.3 La méthylation et déméthylation de MTA1

Le statut de méthylation de MTA1 détermine sa fonction corépressive ou coactivatrice de manière dynamique grâce aux actions des enzymes G9a et LSD1. En effet, la méthylation favorise son rôle de corépresseur avec le complexe NuRD tandis que sa déméthylation promeut son rôle de coactivateur avec le complexe NuRF. Dans un contexte de répression transcriptionnelle d'un gène donné, la méthyltransférase G9a méthyle MTA1

sur la lysine 532 (K532) ce qui favorise d'une part, la fixation de MTA1 sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) pour permettre sa méthylation (H3K9me) par G9a et d'autre part, l'interaction avec CHD4 pour former le complexe NuRD afin de réprimer la transcription. En revanche, lors de la mise en place de l'activation transcriptionnelle de ce gène donné, la déméthylation de MTA1 par LSD1 déstabilise le complexe NuRD en inhibant l'interaction avec CHD4. MTA1 déméthylée reconnaît alors H3K9me pour s'y fixer afin que LSD1 la déméthyle. Enfin, MTA1 recrute le complexe coactivateur NuRF dont l'acétyltransférase P300 qui acétyle H3K9 (H3K9ac) afin d'activer la transcription. Ce modèle dynamique et cyclique permet de réguler la transcription de gènes cibles de MTA1 tels que *EZH2* au cours du cycle cellulaire (Figure 15) (Nair et al., 2013).

4.5.4 L'ubiquitination de MTA1

Enfin, l'ubiquitine ligase COP1 régule la stabilité de MTA1 en favorisant sa dégradation. Précisément, COP1 « ubiquitine » MTA1 au niveau des lysines 182 (K182) et 626 (K626) pour que MTA1 soit dégradée par le protéasome (Figure 15). En retour, MTA1 régule également la stabilité de COP1 en favorisant son auto-ubiquitination et donc, sa dégradation par le protéasome. En résumé, il existe une boucle de régulation entre MTA1 et COP1 pour réguler mutuellement leurs activités (Li et al., 2009b).

4.6 Les protéines MTA dans le cancer

Au niveau de la relevance clinicopathologique de MTA1 dans les cancers humains, de nombreuses méta-analyses indiquent que la surexpression de MTA1 est corrélée positivement aux tumeurs malignes leur conférant le critère de mauvais pronostic. En effet, aujourd'hui, les protéines MTA sont des molécules fortement impliquées dans la carcinogenèse et dans la progression des tumeurs malignes (Toh and Nicolson, 2014b). De plus, MTA1 est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer (Kaur et al., 2014).

Plusieurs études ont montré que le resveratrol et son analogue, le pterostilbene (PTER) qui sont deux composés issus des cacahuètes, grappes et vins de raisin, diminuent la progression tumorale prostatique. En effet, ces molécules inhibent l'expression de *MTA1* entraînant ainsi l'apoptose par deux mécanismes :

- D'une part, P53 n'est plus désacétylée par le complexe HDAC/NuRD et n'est donc plus dégradée (cf 4.2). L'acétylation de P53 engendre l'activation de la transcription des gènes pro-apoptotiques qui entraînent la mort des cellules cancéreuses prostatiques par apoptose (Kai et al., 2010; Li et al., 2013).
- D'autre part, une étude récente a montré que *MTA1* inactive PTEN en le désacétylant grâce à l'association avec les HDACs ce qui entraîne l'activation de la voie de survie PI3K/AKT dans les cellules prostatiques cancéreuses. Donc, l'inhibition de *MTA1* par le resveratrol réactive PTEN qui peut alors induire l'apoptose en activant P53 et en inhibant AKT (Dhar et al., 2015).

La protéine *MTA1* est donc devenue une nouvelle cible thérapeutique prometteuse pour éliminer les cellules cancéreuses.

5 Le gène suppresseur de tumeurs HIC1

5.1 Découverte et structure du gène

Le gène *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) est localisé sur le bras court du chromosome 17 au locus 13.3 (17p13.3), une région télomérique de *P53* situé au locus 13.1 (17p13.1). Cette région chromosomique est fréquemment hyperméthylée ou délétée dans de nombreux cancers. Dans les deux cas, il est observé une perte de l'hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity, LOH) menant à une perte d'expression des gènes localisés dans cette région. De nombreuses tumeurs avaient des délétions 17p en présence d'un gène *p53* fonctionnel, ce qui suggérait l'existence d'autres gènes suppresseur de tumeurs. *HIC1* a été isolé par clonage positionnel à partir du marqueur D17S5 qui est hyperméthylé dans de nombreux cancers d'où le nom Hypermethylated In Cancer 1 (Wales et al., 1995).

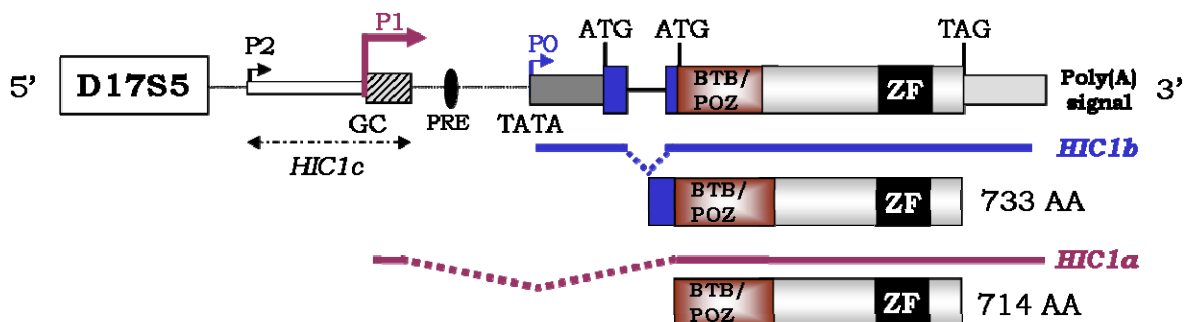


Figure 16 : Représentation schématique du locus codant le gène HIC1 (adaptée de (Fleuriet et al., 2009))

La majeure partie de la séquence codante de la protéine HIC1 est portée par un seul exon régulé par trois promoteurs différents : P0, P1 et P2 (Figure 16). De plus, des mécanismes d'épissage alternatif complexifient le modèle avec la possibilité de six variants différents. Le promoteur riche en GC, P1, est responsable de l'expression du transcrite majeur de HIC1, HIC1a, exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus normaux. Le transcrite minoritaire HIC1b code pour une protéine contenant 19 AA supplémentaires en 5' (Guerardel et al., 2001; Pinte et al., 2004a).

5.2 Régulation de l'expression de *HIC1*

A ce jour, deux protéines régulent la transcription de *HIC1*. D'une part, en 5' du promoteur P0, un site de fixation pour P53 (PRE, P53 Responsive Element) a été identifié (Figure 16). De manière précise, P53 se fixe sur ce PRE pour activer la transcription de *HIC1* (Britschgi et al., 2006; Guerardel et al., 2001). D'autre part, le facteur de transcription E2F1 active également la transcription de *HIC1* en se fixant sur son promoteur en réponse à des dommages à l'ADN (Jenal et al., 2009).

5.3 Perte d'expression de *HIC1* dans les cancers

5.3.1 Hyperméthylation du promoteur

La méthylation de *HIC1* est observée dans de nombreux cancers humains tels que les médulloblastomes, le cancer colorectal, celui de la prostate et celui du sein. L'hyperméthylation du promoteur de *HIC1* conduit à une diminution voire une perte de son expression dans les tissus cancéreux (Jenal et al., 2010). Mais, peu d'études ont été faites sur le lien entre le niveau de méthylation de *HIC1* et son taux d'expression. Lors du développement du cancer du sein, l'augmentation de l'hyperméthylation de *HIC1* est corrélée à l'inhibition de son expression (Fujii et al., 1998). En revanche, la perte de l'expression de *HIC1* au cours du développement des leucémies myéloïdes aiguës (AML) n'est pas corrélée à une augmentation de l'hyperméthylation de son promoteur. Toutefois, elle se détecte dans 100% des cas lors d'une rechute (Issa et al., 1997). Ce dernier constat suggère qu'il existe des mécanismes, autres que l'hyperméthylation du promoteur, inhibant l'expression de *HIC1* pour favoriser la tumorigénèse.

L'hyperméthylation de *HIC1* étant une modification épigénétique, elle est tout à fait réversible. L'utilisation de l'agent déméthylant de l'ADN, 5-azacitidine, permet de déméthylater le promoteur. Ceci induit la réexpression de *HIC1* conduisant à une diminution de la prolifération, un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules de carcinomes du cou, de la tête et du pancréas (Brieger et al., 2012; Zhao et al., 2013).

5.3.2 Gène suppresseur de tumeurs

Un gène suppresseur de tumeurs est un gène dont l'inactivation conduit à la transformation maligne. Ces gènes sont souvent impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réparation des dommages à l'ADN et dans l'induction de l'apoptose.

Le rôle de gène suppresseur de tumeurs de *HIC1* a été clairement démontré grâce à trois modèles animaux : une souris hétérozygote *Hic1* +/- et deux souris double hétérozygotes pour *Hic1* et, soit *p53* ou soit *Ptch1* (*Patched 1*). Alors que les souris homozygotes *Hic1* -/- présentent de gros défauts du développement provoquant une létalité embryonnaire (cf 5.4), les souris hétérozygotes *Hic1* +/- développent tardivement des tumeurs spontanées. De manière surprenante, le spectre de tumeurs développées est différent en fonction du sexe de l'animal : 75% des mâles développent préférentiellement des cancers épithéliaux et 85% des femelles développent des sarcomes et des lymphomes. De plus, le deuxième allèle *Hic1* restant fonctionnel est inactivé par hyperméthylation du promoteur, également observée dans les cancers humains (Chen et al., 2003b).

Les gènes *Hic1* et *p53* sont localisés sur le même chromosome chez la souris, le 11, comme chez l'homme, le 17. Un modèle de souris double hétérozygote pour ces deux gènes montre que *Hic1* coopère avec *p53* pour favoriser la tumorigénèse. Lorsque l'inactivation des deux gènes est réalisée en *trans* (sur des chromosomes différents), l'incidence des tumeurs mammaires et ovariennes est plus élevée que chez les souris hétérozygotes *p53* +/- . En revanche, lorsque l'inactivation est réalisée en *cis* (sur le même chromosome), les souris développent plus rapidement des tumeurs que les souris hétérozygotes *p53* +/- . De plus, dans les deux cas, il y a une plus forte incidence d'ostéosarcomes métastatiques que chez les souris hétérozygotes *p53* +/- . Enfin, le deuxième allèle fonctionnel de *Hic1* est inactivé différemment selon qu'il soit situé sur le même chromosome que l'allèle *p53* fonctionnel ou non. En *trans*, le promoteur de *Hic1* est méthylé tandis qu'en *cis*, *Hic1* et *p53* sont inactivés par délétion (Chen et al., 2004).

Un deuxième modèle de souris double hétérozygote montre que *Hic1* coopère avec *Ptch1* (*Patched 1*) dans la formation de médulloblastomes qui sont des tumeurs cérébrales particulièrement agressives. D'une part, *Ptch1* est le récepteur de Hh (Hedgehog) pour inhiber cette voie lors de la différenciation des cellules précurseurs granulaires du cervelet (GCP). Le gène *Ptch1* est muté dans 20% des médulloblastomes ce qui conduit à une activation accrue de la voie Hh menant à une prolifération anormale des GCPs. D'autre part, le gène *Hic1* est délété dans 50% des médulloblastomes. *Hic1* réprime *Atoh1* (*Atonal homolog 1*) qui est un facteur de transcription proneuronal, effecteur de la voie Hh. Les souris double hétérozygotes *Hic1* +/- *Ptch1* +/- développent quatre fois plus de médulloblastomes que les souris *Ptch1* +/- avec le même laps d'apparition des tumeurs contrairement au modèle *Hic1* +/- *p53* +/- . Cette étude montre que *Hic1* et *Ptch1* coopèrent pour réprimer, respectivement, directement et indirectement *Atoh1* pendant la phase de différenciation des GCP (Boulay et al., 2012a; Briggs et al., 2008). La non-répression d'*Atoh1* lors de cette phase du développement du cervelet entraîne la formation de médulloblastomes (Briggs et al., 2008).

Ces trois modèles de souris confortent donc le rôle de gène suppresseur de tumeurs de *HIC1*. De plus, *HIC1* est également impliqué dans la régulation du développement.

5.4 *HIC1* dans le syndrome de Miller-Dieker

Le syndrome de Miller-Dieker (MDS) résulte de la délétion de plusieurs gènes dont *HIC1*, dans la région 17p13.3 entraînant l'haploinsuffisance de ces gènes. De manière précise, plus la délétion est grande, plus le syndrome est sévère (Cardoso et al., 2003). Ce syndrome est caractérisé entre autres, par un développement anormal du cerveau nommé lissencéphalie ainsi que des dysmorphies faciales provoquant un retard mental important et une mortalité infantile. Les gènes *Hic1* murin et humain possèdent 88% et 95 % d'homologie au niveau, respectivement, de la séquence nucléotidique et protéique. Dans un premier temps, une étude a montré que les sites d'expression de *HIC1* au cours du développement embryonnaire murin

correspondent aux territoires malformés chez les patients atteints de MDS (Grimm et al., 1999). Dans un second temps, le gène *Hic1* a été invalidé par recombinaison homologue. Chez des souris homozygotes *Hic1*^{-/-}, une mort embryonnaire est alors observée due à de gros défauts du développement tels que la malformation des membres, la formation d'un omphalocoele ou d'une exencéphalie. Des malformations au niveau des mêmes organes sont retrouvées chez les patients atteints de MDS (Carter et al., 2000).

Ces études suggèrent mais ne démontrent pas formellement l'implication de *HIC1* dans cette maladie.

5.5 Structure de la protéine *HIC1*

La protéine *HIC1* synthétisée à partir du transcrit majeur *HIC1A*, compte 714 acides aminés correspondant à un poids moléculaire apparent de 80 kDa (kiloDalton) et est organisée en trois domaines fonctionnels :

- un domaine N-terminal BTB/POZ (Broad complex, Tramtrack and Bric à brac/Poxviruses and Zinc finger), domaine de répression transcriptionnelle autonome indépendant des HDACs de classes I et II (insensible à la trichostatine A, inhibiteur spécifique de ces deux classes d'HDACs) et d'homo ou hétérodimérisation impliqué dans l'interaction entre protéines (Deltour et al., 1999)
- une région centrale qui est également un domaine de répression transcriptionnelle autonome inhibé par la trichostatine A, mettant en évidence l'interaction avec des HDACs de classes I et II présentes dans les complexes corépresseurs (Deltour et al., 2002)
- un domaine C-terminal qui est structuré autour de cinq doigts de zinc (ZF) de type Krüppel C₂H₂ permettant la liaison à l'ADN. Les ZF3 et 4 de *HIC1* lui permettent de se fixer sur une séquence consensus d'ADN nommée HiRE (HIC1 Responsive Element) : 5' ^c/_GNG^c/_GG**GGCA**^c/_ACC 3' centré sur le motif **GGCA** (Figure 17) (Pinte et al., 2004b).

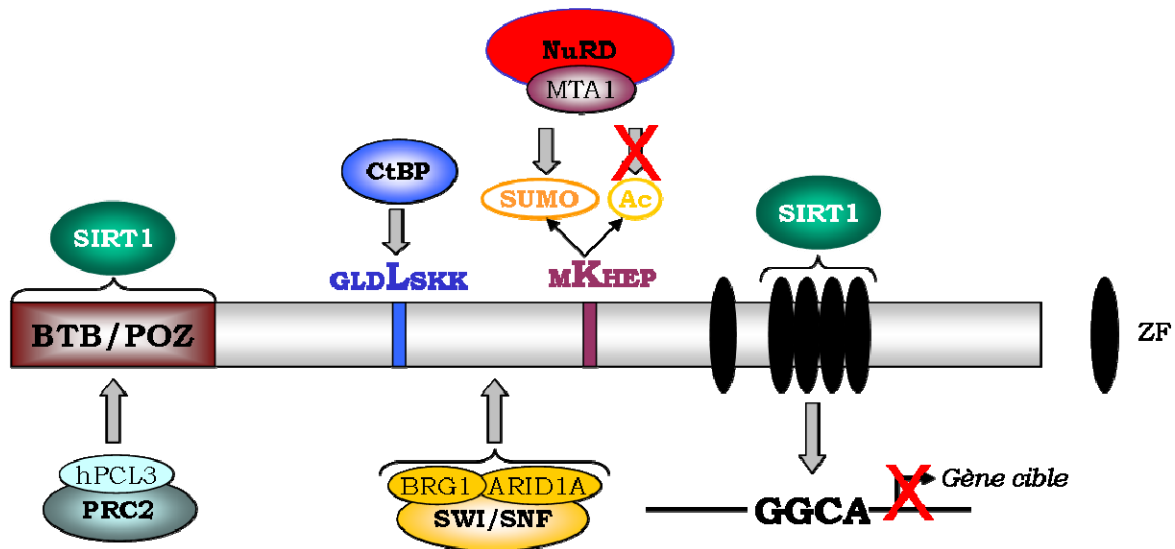


Figure 17 : Structure schématique de HIC1 pouvant recruter différents complexes ou protéines corépresseurs

Au niveau de la région centrale de HIC1, des motifs peptidiques permettent le recrutement de différents co-répresseurs : un motif conservé GLDLSKK interagissant avec le co-répresseur CtBP et un motif MKHEP modulant le recrutement du complexe NuRD (Figure 17) (Deltour et al., 2002; Van Rechem et al., 2010).

5.6 Rôle de répresseur transcriptionnel

Comme évoqué précédemment, le domaine BTB/POZ de HIC1 est un domaine de répression transcriptionnelle autonome. En effet, le BTB/POZ seul réprime la transcription indépendamment des HDACs de classes I et II (Deltour et al., 1999). Toutefois, ce domaine interagit avec une HDAC de classe III, SIRT1 (Silent mating type Information Regulation 2 homolog 1) pour former un complexe répresseur se fixant sur le promoteur de **SIRT1**, lui-même, pour inhiber sa transcription (Chen et al., 2005; Dehennaut et al., 2012). *SIRT1* fut d'ailleurs le premier gène cible direct de HIC1 décrit (Chen et al., 2005).

En ce qui concerne la région centrale, l'alignement de séquences entre HIC1 et son paralogue HRG22 (HIC1-Related Gene on chromosome 22) a mis en évidence des motifs peptidiques conservés (Deltour et al., 2001). Ces

motifs peptidiques permettent le recrutement de complexes corépresseurs tels que CtBP et NuRD (Deltour et al., 2002; Van Rechem et al., 2010).

5.6.1 Recrutement des protéines CtBPs

Dans la région centrale de HIC1, un motif peptidique de séquence GLDL⁽²²⁵⁾SKK centré sur la lysine 225 (L225) permet l'interaction avec CtBP1 et CtBP2 (Figure 17) (Deltour et al., 2002). Les protéines CtBPs (C-terminal Binding Protein) forment des dimères en fonction du taux de NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) dans la cellule. De manière plus précise, un taux élevé de NADH favorise la dimérisation de CtBP et la formation de complexes corépresseurs contenant notamment des HDACs et la déméthylase LSD1 pour réprimer la transcription (Chinnadurai, 2007). A ce jour, le recrutement de CtBP permet à HIC1 de réprimer deux de ces gènes cibles : **SIRT1** et **CXCR7** (CXC Chemokine Receptor 7) (Figure 18) (Van Rechem et al., 2009a; Zhang et al., 2007).

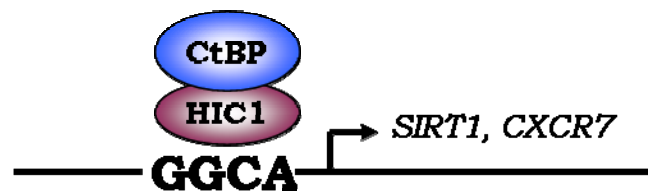


Figure 18 : HIC1 recrute CtBP pour réprimer SIRT1 et CXCR7

Le gène *CXCR7* code un récepteur couplé à une protéine G (GPCR) activé par la chimiokine CXCL12/SDF1 (CXC motif Ligand 12/Stromal cell-Derived Factor 1) comme le récepteur CXCR4. CXCR7 est considéré comme un « récepteur leurre » pour SDF1 car suite à sa fixation, la protéine G n'est pas activée. De manière précise, il y a une mutation dans un motif peptidique de CXCR7 impliqué dans l'interaction avec la protéine G. En revanche, des études récentes ont montré que CXCR7 est capable de s'hétérodimériser avec CXCR4. Lors de la fixation de SDF1 sur ces hétérodimères, CXCR7 active la β -arrestine suivi des voies de signalisation en aval pour promouvoir la migration des cellules. De plus, CXCR7 est surexprimée dans de nombreux cancers et favorise la formation de métastases (Sánchez-Martín et al., 2013).

5.6.2 Recrutement du complexe NuRD

Grâce à un crible double hybride en levure utilisant comme appât le domaine BTB/POZ suivi de la région centrale de HIC1, l'extrémité C-terminale de MTA1 a été isolée. De plus, il s'avère que l'interaction entre HIC1 et MTA1 est régulée par une balance entre deux MPTs ciblant la lysine K314 du motif MK⁽³¹⁴⁾HEP de HIC1 : la SUMOylation et l'acétylation. En effet, l'acétylation inhibe l'interaction avec MTA1 alors que la SUMOylation la favorise, la compétition entre ces deux MPTs module donc l'activité de répression transcriptionnelle de HIC1 (Van Rechem et al., 2010). Dans des cellules quiescentes, deux gènes, ***P57KIP2*** et ***Cycline D1***, sont réprimés par HIC1 grâce au recrutement du complexe NuRD (Figure 19) (Van Rechem et al., 2010).

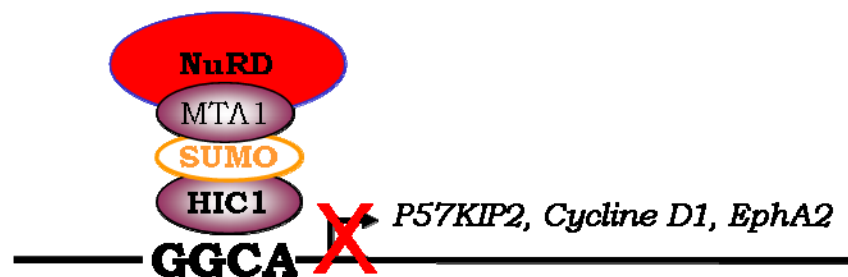


Figure 19 : HIC1 réprime *P57KIP2*, *Cycline D1* et *EphA2* en recrutant le complexe NuRD

Ces deux gènes codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : *P57KIP2* code pour un inhibiteur des CDKs (Cyclin Dependent Kinase) et *Cycline D1* code pour une protéine qui en s'associant avec les CDKs, favorise la progression du cycle cellulaire. Il semblerait donc que HIC1 régule deux protéines ayant des rôles opposés au niveau du cycle cellulaire. Toutefois, à faible expression, *P57KIP2* promeut la formation de complexes Cycline/CDK favorisant la progression du cycle cellulaire (Pateras et al., 2009).

Une autre étude de l'équipe montre également qu'***EphA2***, qui code pour un des récepteurs tyrosine-kinase liant Ephrin-A1, est également réprimé par HIC1 recrutant MTA1 (Figure 19). Dans des cellules épithéliales normales du sein, l'inhibition de HIC1 par siRNA induit l'augmentation de

l'expression d'*EphA2* et favorise la migration et l'invasion cellulaires (Foveau et al., 2012).

5.6.3 Recrutement du complexe SWI/SNF

HIC1 recrute également le complexe SWI/SNF (SWItching and Sucrose Non-Fermenting) au niveau du gène ***ATOH1*** pour réprimer sa transcription dans des fibroblastes quiescents (Figure 20).



Figure 20 : HIC1 recrute le complexe SWI/SNF pour réprimer ATOH1

De manière précise, HIC1 interagit avec la sous-unité non catalytique ARID1A (A-T Rich Interaction Domain 1A) et avec l'ATPase BRG1 (Brahma Related Gene 1) pour recruter le complexe SWI/SNF au niveau du promoteur de *ATOH1* (Van Rechem et al., 2009b; Zhang et al., 2009). Ce complexe de remodelage de la chromatine dépendant d'une ATPase, soit BRM (Brahma) ou soit BRG1, est composé également de 10, au maximum, sous-unités non catalytiques nommées ARID ou BAF (Brg1/Brm Associated Factor). Ces dernières sont impliquées dans le ciblage et l'activité du complexe (Wilson and Roberts, 2011).

5.6.4 Recrutement du complexe PRC2

Le crible double hybride a également montré que HIC1 recrute le complexe PRC2 via les protéines hPCL3 (human Polycomb-like 3), nommées aussi PHF19 (PHD Finger protein 19) (Boulay et al., 2012a). La protéine hPCL3 est l'une des 3 homologues humains des Polycomb-like de la drosophile avec hPCL1/PHF1 et hPCL2/MTF2 (Boulay et al., 2011). Ces protéines sont retrouvées dans le complexe PRC2 où elles ne sont impliquées ni dans la formation, ni dans la stabilité du complexe mais, dans le ciblage du complexe PRC2 au niveau du promoteur de gènes transcriptionnellement

actifs. De manière plus précise, hPCL3 reconnaît la lysine 36 triméthylée de l'histone H3 (H3K36me3) qui est une marque activatrice, pour s'y fixer et recruter PRC2 en compagnie d'une histone déméthylase KDM (Figure 21A). Cette dernière déméthyle H3K36me3 pour permettre la méthylation de H3K27 par EZH2 afin d'induire la répression de cette région (Figure 21B) (Di Croce and Helin, 2013).

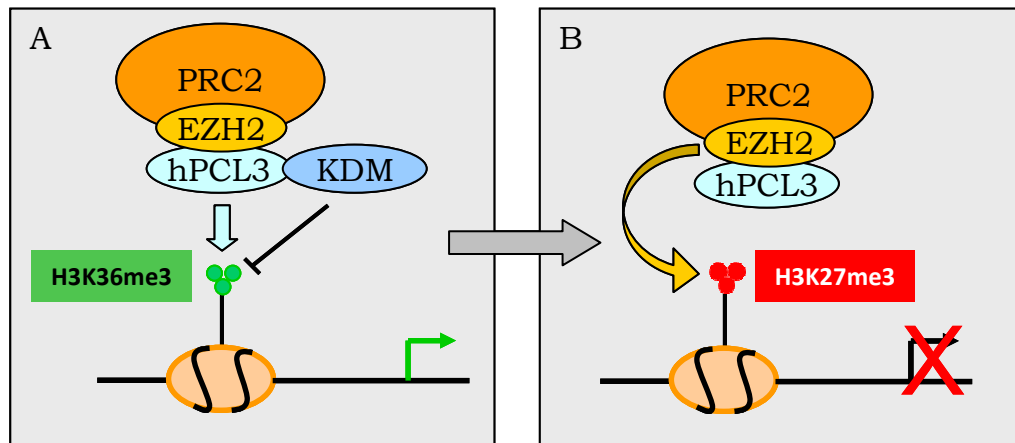


Figure 21 : Rôle des protéines hPCL3 dans la mise en place de la répression transcriptionnelle au niveau d'une région génique transcriptionnellement active.

Les trois protéines hPCL sont structurées de manière similaire avec un domaine TUDOR en N-terminal suivi de deux domaines PHD. Pour hPCL3, les domaines TUDOR et PHD2 sont impliqués dans l'interaction avec EZH2 et H3K36me3, respectivement (Boulay et al., 2011; Di Croce and Helin, 2013). De plus, ces domaines sont également responsables de l'interaction avec HIC1 et précisément, avec le domaine BTB/POZ de HIC1. En effet, HIC1 recrute les complexes PRC2 au niveau de certains gènes cibles tels que **ATOH1**, **EFNA1** (*Ephrin-A1*) et **CXCR7** grâce à l'interaction avec les protéines hPCL3 (Figure 22) (Boulay et al., 2012a).



Figure 22 : HIC1 réprime ATOH1, EFNA1 et CXCR7 en recrutant le complexe PRC2

En ce qui concerne *ATOH1*, il code un facteur de transcription proneuronal nécessaire au développement du cervelet murin puis réprimé par HIC1 (Boulay et al., 2012a; Briggs et al., 2008). Quand à *EFNA1*, il code un ligand fixant les récepteurs tyrosine-kinase de type Eph comme EphA2, régulé par HIC1 au cours du développement. La surexpression de EFNA1 due à l'inactivation de HIC1 favorise la croissance tumorale *in vivo* (Zhang et al., 2010). De plus, le récepteur EphA2 est également un gène cible de HIC1 (Foveau et al., 2012). Donc, la perte de la régulation de la voie Eph par l'hyperméthylation du promoteur de HIC1 joue certainement un rôle important dans le tumorigénèse épithéliale.

5.6.5 HIC1 Réprime également d'autres gènes

En résumé, HIC1 réprime certains de ces gènes cibles grâce au recrutement de protéines ou de quatre complexes corépresseurs différents (Figure 17). Une étude d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage (ChIP-Seq) serait nécessaire pour définir plus précisément les gènes cibles directs de HIC1.

A ce jour, d'autres gènes sont également réprimés par HIC1 :

- **FGF-BP1** (Fibroblast Growth Factor-Binding Protein 1) est un gène cible de HIC1 impliqué dans l'angiogénèse. Ce gène code pour une protéine liée à la matrice extracellulaire essentielle à l'activation du FGF (Fibroblast Growth Factor) en permettant son relargage de la matrice extracellulaire. Précisément, suite à une stimulation au TGF- β (Transforming-Growth Factor-beta), HIC1 réprime l'expression de *FGF-*

BP1 pour inhiber l'action du FGF et induire la différenciation des cellules musculaires lisses (Briones et al., 2006).

- ***ΔNP73*** code pour une protéine tronquée du domaine de transactivation de P73, membre de la famille P53, agissant comme un dominant-négatif inhibant P53. Dans les tissus normaux et cancéreux, l'expression de *ΔNP73* est inversement corrélée à l'expression de *HIC1*, *HIC1* réprimant directement le promoteur de *ΔNP73* (Vilgelm et al., 2010).
- ***Sox9*** (SRY-box containing gene 9) code un facteur de transcription nécessaire à la régulation des gènes impliqués dans le développement de l'intestin, au niveau des cryptes du colon (Mohammad et al., 2011). Son expression est inhibée dans des cellules d'ostéosarcomes, U2OS surexprimant *HIC1* après infection adénovirale, comme les gènes *CXCR7*, *Cyclin D1* et *EphA2* (Van Rechem et al., 2009a). De plus, *Sox9* est un gène cible direct de *HIC1* (Mohammad et al., 2011).
- ***ADRB2*** (β -2 Adrenergic Receptor) est un gène cible direct de *HIC1* codant pour un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) activé par les hormones du stress telles que l'adrénaline et la noradrénaline (Boulay et al., 2012b). L'activation accrue de ce récepteur favorise l'angiogénèse, la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo* (Pérez-Sayáns et al., 2010).
- ***P21*** est un gène cible direct de *HIC1* et code un inhibiteur des CDKs comme *P57KIP2*, impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN (Dehennaut et al., 2013a). Précisément, lors de dommages à l'ADN, P53 est stabilisée et active la transcription de *P21* qui stoppe la progression du cycle cellulaire pour la mise en place des mécanismes de réparation.
- ***ApoER2*** et ***VLDLR*** sont des gènes cibles directs de *HIC1* codant pour des récepteurs ayant pour ligand commun la Reelin. La voie Reelin est impliquée dans la migration des précurseurs neuronaux pendant le développement du cervelet (cf Publication n°3 (Dubuissez et al., 2013)). Ces gènes cibles de *HIC1* associés à *ATOH1* confèrent un rôle important de *HIC1* dans la régulation du développement du cervelet.
- ***TLR2*** (Toll-Like Receptor 2) vient s'ajouter à la liste des gènes cibles de *HIC1* codant des récepteurs tels que *ADRB2*, *CXCR7* et *EphA2*. Dans

l'intestin, le rôle de TLR2 est de détecter des agents pathogènes afin d'initier l'inflammation et la réponse immunitaire. Suite à la fixation de son ligand, TLR2 active la voie NF- κ B qui active l'expression de cytokines pro-inflammatoires. L'inhibition de l'expression de *HIC1* dans les cellules épithéliales de l'intestin induit une augmentation de l'expression de *TLR2* qui favorise la croissance des tumeurs colorectales induites par des agents chimiques chez la souris (Janeckova et al., 2015).

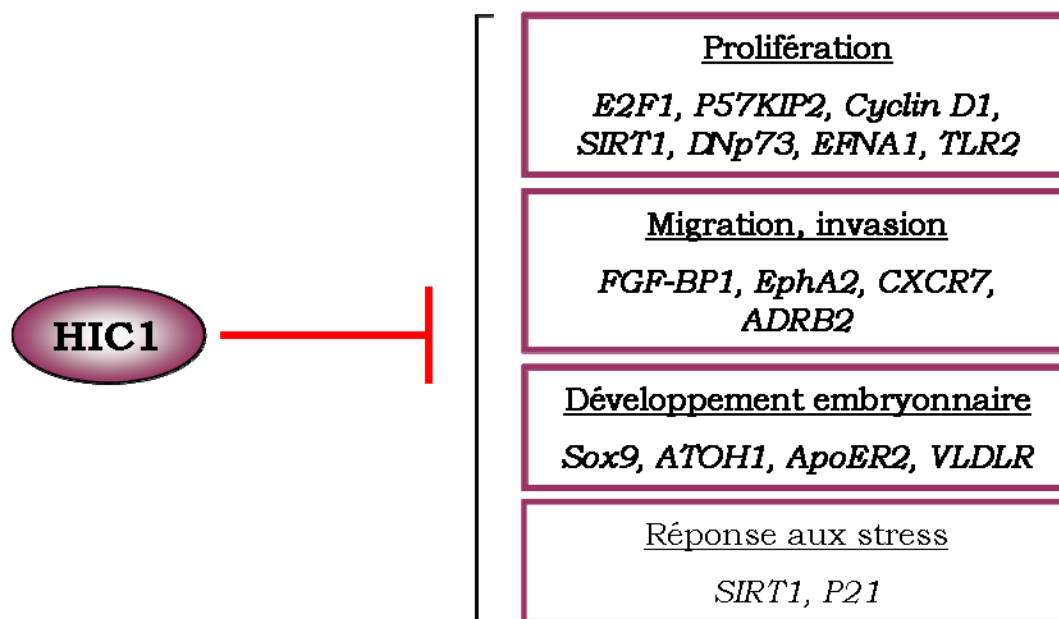


Figure 23 : Récapitulatif des gènes cibles directs de HIC1 : HIC1 réprime des gènes régulant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires mais aussi impliqués dans le développement embryonnaire et dans la réponse à différents stress tels que les dommages à l'ADN.

5.7 Autres rôles

5.7.1 Dans la régulation d'autres facteurs de transcription

Bien que la fonction prédominante de HIC1 soit de réprimer la transcription de ses gènes cibles, quelques études ont montré qu'elle régule également l'activité d'autres facteurs de transcription (Figure 24).

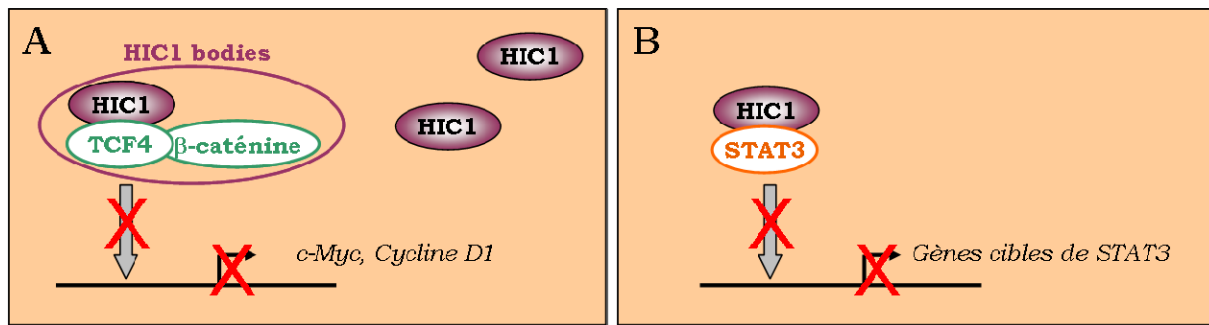


Figure 24 : HIC1 régule négativement l'activité de TCF4 en le séquestrant dans des « HIC1 bodies » (A) et l'activité de STAT3 en interagissant avec son domaine de fixation à l'ADN (B).

D'une part, HIC1 régule de manière indirecte la voie Wnt/ β -caténine. En effet, HIC1 inhibe l'activité du facteur de transcription TCF4 en le séquestrant dans des structures nucléaires nommées « HIC1 bodies ». TCF4 est une protéine effectrice de la voie Wnt/ β -caténine qui interagit avec la β -caténine pour activer la transcription des gènes tels que *c-Myc* et *Cycline D1* en réponse à l'activation de cette voie. De manière plus précise, dans des cellules exprimant peu de HIC1, les complexes TCF4/ β -caténine activent les gènes cibles de TCF4. En revanche, lorsque HIC1 est fortement exprimée, elle interagit avec les complexes TCF4/ β -caténine pour les séquestrer dans les « HIC1 bodies » et empêcher leur fixation sur les gènes cibles de TCF4 (Figure 24A) (Valenta et al., 2006). De plus, la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine par l'inactivation de HIC1 favoriserait la tumorigénèse.

D'autre part, HIC1 régule également l'activité du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3). STAT3 est une oncoprotéine surexprimée ou activée constamment dans de nombreux cancers humains. Elle active, entre autres, la transcription de gènes anti-apoptotiques et favorise donc la tumorigénèse. Précisément, HIC1 interagit avec STAT3 au niveau de son domaine de fixation à l'ADN l'empêchant ainsi de se fixer sur ses gènes cibles (Figure 24B) (Lin et al., 2013).

En résumé, HIC1 inhibe l'action des facteurs de transcription TCF4 et de STAT3 non pas en réprimant directement leur expression, mais en interagissant avec eux pour empêcher leur fixation au niveau de leurs gènes cibles.

5.7.2 Dans la réparation des dommages à l'ADN

Jusqu'à ce jour, certaines études ont montré l'implication de HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN, qu'ils soient non réparables (16h Etoposide) ou réparables (1h Etoposide) (Chen et al., 2005; Dehennaut et al., 2013a).

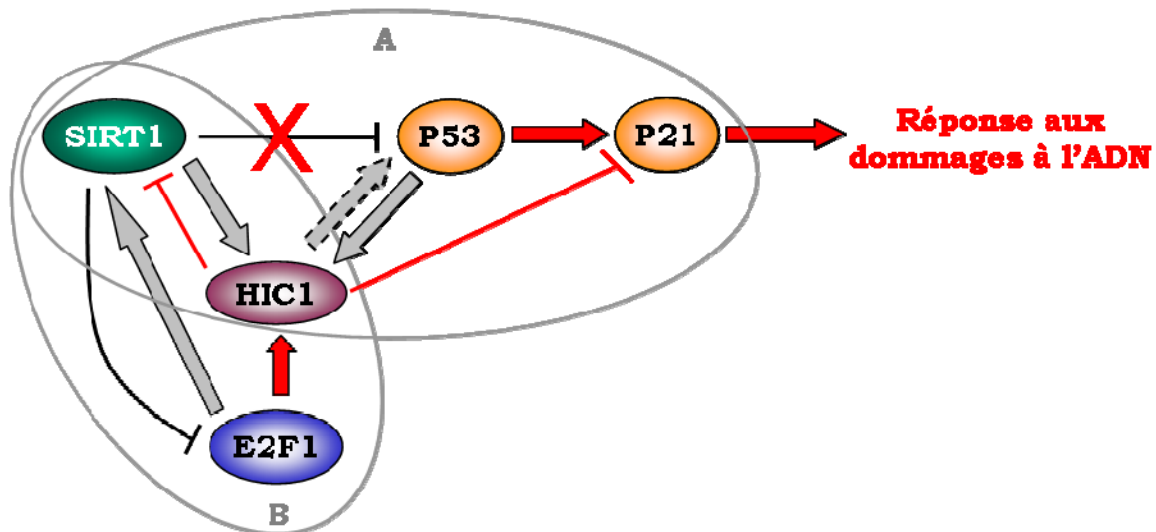


Figure 25 : Boucles de régulation impliquant (A) HIC1, SIRT1, P53 et P21 et, (B) HIC1, E2F1 et SIRT1. Des dommages à l'ADN induisent les évènements colorés en rouge.

Dans un premier temps, HIC1 est au centre d'une boucle de régulation avec P53 et SIRT1. Précisément, d'une part, *SIRT1* et *HIC1* sont tous deux des gènes cibles de P53 et d'autre part, SIRT1 désacétyle P53 pour l'inactiver et HIC1 pour l'activer (Stankovic-Valentin et al., 2007; Vaziri et al., 2001). Cependant, en réponse à des dommages à l'ADN non réparables, HIC1 réprime l'expression de *SIRT1* permettant ainsi l'induction de l'apoptose par l'activation de P53 (Figure 25A) (Chen et al., 2005). Récemment, cette boucle de régulation s'est complexifiée avec l'ajout de P21. De manière plus précise,

P53 active rapidement la transcription de *P21* après la détection de dommages à l'ADN pour stopper la progression du cycle cellulaire et mettre en place des mécanismes de réparation. Puis, HIC1 réprime la transcription de *P21* pour soit, la reprise du cycle cellulaire lors de dommages réparables ou soit, induire l'apoptose lors de dommages non réparables (Figure 25A) (Dehennaut et al., 2013a). Enfin, une étude récente a montré que l'inhibition de HIC1 par siRNA induisait un arrêt dans le cycle cellulaire à la transition G2/M avec une augmentation de l'expression de *P53* et de *P21* (Kumar, 2014). *P21* étant un gène cible direct de HIC1, l'augmentation de son expression est cohérente (Dehennaut et al., 2013a). En revanche, l'augmentation de *P53*, responsable de l'arrêt en G2/M, est surprenante puisque l'inhibition de HIC1 induit une augmentation de *SIRT1* qui inactive et désacétyle P53 (Chen et al., 2005). Cette étude suggère donc qu'il existerait un mécanisme de rétrocontrôle entre P53 et HIC1 où P53 active *HIC1* qui à son tour inhiberait la transcription de *P53* (Figure 25A).

De plus, HIC1 est également impliqué dans une autre boucle de régulation comprenant E2F1 et SIRT1 (Figure 25B). Précisément, E2F1 active la transcription de *HIC1* en réponse à des dommages à l'ADN (Jenal et al., 2009) et E2F1 active également la transcription de *SIRT1* qui en retour la désactive en la désacétylant (Wang et al., 2006).

En résumé, HIC1 est au centre de deux boucles de régulation impliquées en partie dans la réponse aux dommages à l'ADN et mettant en jeu des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle (Figure 25). De plus, récemment, nous avons montré que l'induction de dommages à l'ADN non réparables favorise la SUMOylation de HIC1 pour le recrutement des complexes NuRD-MTA1 au niveau de gènes cibles qui restent à déterminer (Dehennaut et al., 2013b). Cette étude suggère que lors de dommages à l'ADN, SIRT1 désacétylerait HIC1 afin qu'elle puisse être SUMOylée et recruter le complexe NuRD via MTA1.

Dans un second temps, HIC1 joue également un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN puisque l'inhibition de son expression induit une persistance et une réparation plus lente des cassures de l'ADN

(Dehennaut et al., 2013b). De plus, l'équipe a montré que l'implication de HIC1 dans la réparation des dommages à l'ADN est dépendante de la phosphorylation par ATM et de l'acétylation de deux résidus localisés en région C-terminale, discutés dans le chapitre suivant (Paget et al., résultats non publiés).

Les différents rôles de HIC1, décrits précédemment, qu'ils soient transcriptionnels ou non transcriptionnels, sont régulés par des MPTs au niveau de sa région centrale et de son extrémité C-terminale.

5.8 Régulation de HIC1 par des MPTs

5.8.1 La compétition acétylation/SUMOylation de la lysine 314

La lysine 314 (K314) de HIC1 est la cible de la SUMOylation au sein d'un motif de type Ψ KXEP où Ψ est un acide aminé hydrophobique et X n'importe quel acide aminé. Dans le cas de HIC1, Ψ correspond à une méthionine (M) et X à une histidine (H) pour donner le motif MKHEP.

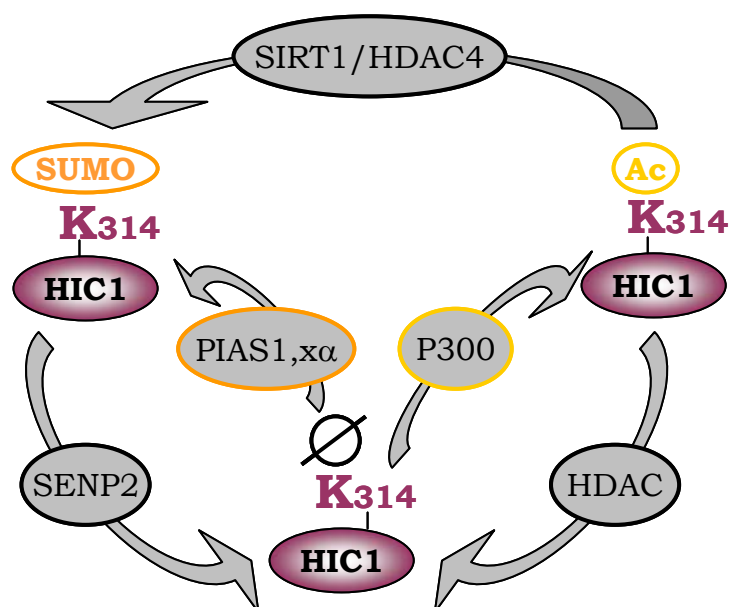


Figure 26 : Régulation des MPTs au niveau de la lysine 314 de HIC1

De manière plus précise, SUMO1 est liée de manière covalente par les E3 ligases PIAS1 et PIASx α et peut être enlevée par la désSUMOylase SENP2. De plus, cette lysine 314 est également la cible de l'acétylation par P300. Une compétition entre acétylation et SUMOylation existe donc au niveau du site MKHEP de HIC1. Elle est régulée par deux histones désacétylases : une de classe III, SIRT1 et une de classe II, HDAC4. Précisément, SIRT1 désacétyle K314 puis, HDAC4 favorise sa SUMOylation de façon indépendante de son domaine catalytique de désacétylation (Figure 26) (Stankovic-Valentin et al., 2007).

Ces MPTs au niveau du même site permettent de réguler la fonction de répresseur transcriptionnel de HIC1 comme décrit précédemment.

5.8.2 La O-GlcNAcylation de HIC1

HIC1 peut également être O-GlcNAcylé dans la région C-terminale et plus précisément au niveau de son domaine de fixation à l'ADN (Figure 27). Toutefois, cette MPT n'interfère pas dans la fixation de HIC1 à l'ADN. De plus, le domaine BTB/POZ est nécessaire pour une glycosylation correcte de HIC1 (Lefebvre et al., 2004). Le rôle supposé de cette MPT serait de réguler le recrutement de protéines.

5.8.3 La phosphorylation et l'acétylation de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN

Enfin, HIC1 est phosphorylée par la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et acétylée par l'acétyltransférase Tip60 en réponse à des dommages à l'ADN réparables. De manière plus précise, lors de la réponse aux dommages à l'ADN, d'une part, ATM activée phosphoryle la sérine 694 (S694) et, d'autre part, Tip60 activée acétylerait la lysine 623 (K623) (Figure 27). Ces deux MPTs seraient impliquées dans la mise en place du rôle de HIC1 dans la réparation des dommages à l'ADN peut-être en ciblant HIC1 aux points de cassures pour moduler le recrutement de protéines des complexes de réparation (Paget et al., résultats non publiés).

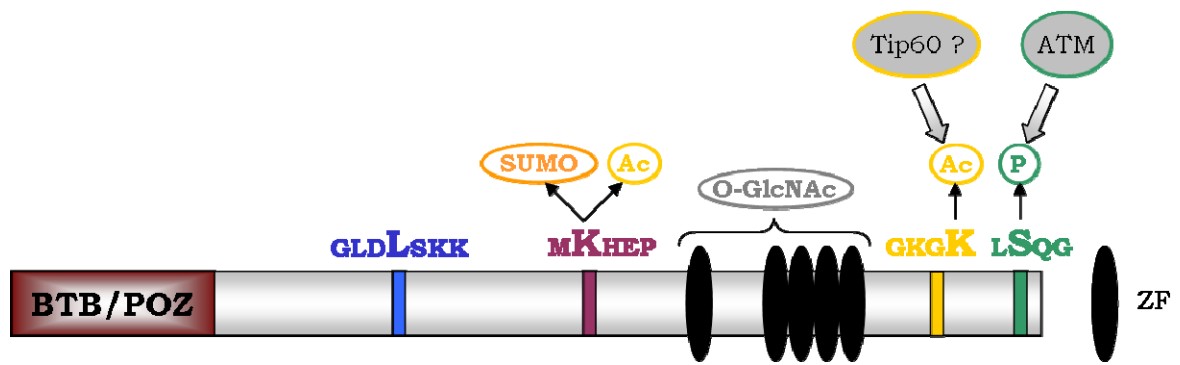


Figure 27 : Schémas récapitulatif des MPTs modulant les rôles de HIC1

6 Les protéines BCL11

6.1 Découverte des protéines BCL11

La famille BCL11 (B-Cell Lymphoma/Leukemia 11), nommée aussi CTIP (COUP-TF [Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factors]-Interacting Protein) comprend deux protéines homologues : BCL11A (EVI9, CTIP1) et BCL11B (CTIP2, Rit1), découvertes à la même période par plusieurs laboratoires distincts. Pour simplifier les choses, je les nommerai BCL11A et BCL11B mais tout d'abord, voici le « pourquoi » de tous ces noms.

6.1.1 Baptisée *Evi9* chez la souris puis *BCL11A* chez l'homme

Le gène *Bcl11a*, nommée *Evi9* (*Ecotropic viral integration site 9*), fut d'abord découvert chez la souris en tant que site d'intégration proviral dans les leucémies BXH2 (Nakamura et al., 2000). Puis, une étude a montré que l'homologue humain *EVI9* est exprimé dans des cellules myéloïdes (monocytes, mégakaryocytes). Le gène humain *EVI9* est localisé sur le chromosome 2 en position 13 (2p13) (Saiki et al., 2000). La caractérisation de la translocation t(2;14)(p13;q32.3) dans de nombreuses pathologies malignes des lymphocytes B telles que les leucémies lymphoïdes chroniques a mis en évidence la dérégulation du gène *EVI9* d'où son nom chez l'homme : *B-Cell Lymphoma/Leukemia 11 A (BCL11A)* (Satterwhite et al., 2001).

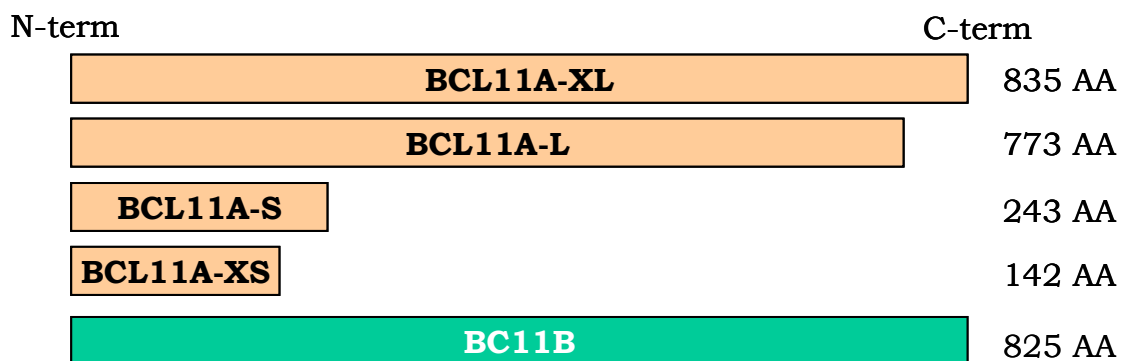


Figure 28 : Schéma des quatre isoformes de BCL11A et de BCL11B

De plus, suite à l'épissage alternatif du pré-ARNm, quatre variants BCL11A sont transcrits : BCL11A-XL (eXtra Long), BCL11A-L (Long), BCL11A-S (Short) et BCL11A-XS (eXtra Short) (Figure 28). Les exons codants 1 et 2 sont communs à toutes les isoformes, seule la partie C-terminale diffère. La protéine BCL11A-XL est la forme prédominante exprimée dans les tissus sains tandis que les cellules B malignes expriment plutôt l'isoforme courte BCL11A-S (Liu et al., 2006, 2003).

6.1.2 Nommée CTIP2 mais aussi *Bcl11b* et plus tard *Rit1*

La protéine BCL11B fut d'abord isolée avec les membres de la famille des protéines COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor), une sous-famille de récepteurs orphelins, et fut donc nommée en conséquence COUP-TF-Interacting Protein 2 (CTIP2). Par ailleurs, BCL11A (CTIP1) interagit également avec les protéines COUP-TFs. Précisément, BCL11A (CTIP1) et BCL11B (CTIP2), toutes deux fortement exprimées dans le cerveau, agissent en tant que corépresseurs des protéines COUP-TFs (Avram et al., 2000).

De plus, le gène *BCL11B* se situe sur le chromosome 14 en 32.1 (14q32.1) et code pour une protéine exprimée préférentiellement dans les cellules lymphoïdes mais aussi dans le cerveau. Ce locus est associé à une translocation (t15 ;14)(q35 ;q32) retrouvée dans plus de 20% des leucémies aiguës à cellules T (T ALL, T Acute Lymphoblastic Leukaemia) (Bernard et al., 2001). BCL11A et BCL11B présentent 67% d'homologie de séquence nucléotidique et 61% au niveau protéique (Satterwhite et al., 2001).

Enfin, en 2003, le gène *Bcl11b* fut également nommé *Rit1* (Radiation-induced tumor suppressor gene 1) pour son rôle de gène suppresseur de tumeurs dans les lymphomes thymiques induits par radiation chez la souris (Wakabayashi et al., 2003a).

6.2 Structure des protéines BCL11

Les protéines BCL11A-XL et BCL11B possèdent toutes deux six doigts de zinc (ZF) de type Krüppel C₂H₂ présentant 95% de similarité (Satterwhite et

al., 2001). Les ZF3 et 4 des protéines BCL11 leur permettent de se fixer sur une séquence consensus d'ADN riche en GC : 5'-GGCCGG-3' (Avram et al., 2002). De plus, un domaine riche en glycines (G) et glutamines (E) est présent en amont des 3 ZFs C-terminaux de BCL11B (Figure 29).

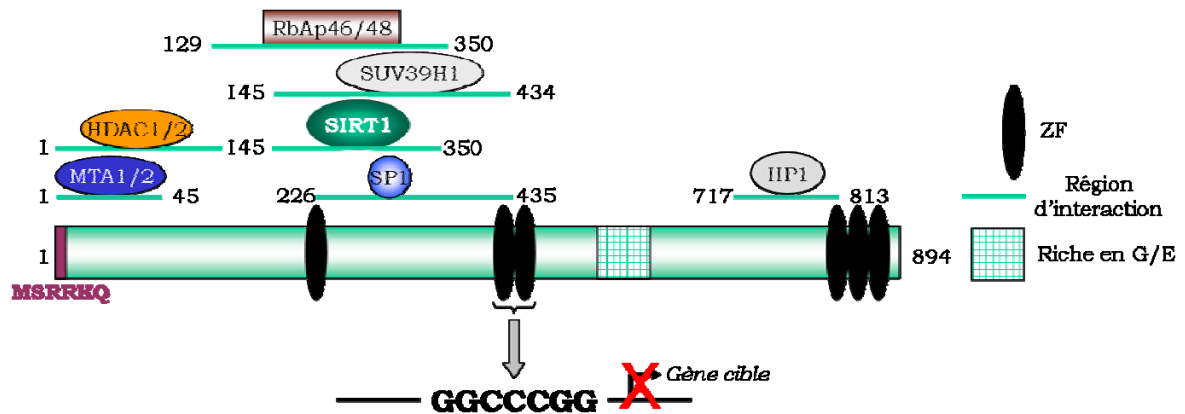


Figure 29 : Structure schématique de BCL11B et localisation des domaines d'interactions avec les différents complexes et protéines corépresseurs (adaptée de (Kominami, 2012))

Outre son rôle de corépresseur des protéines COUP-TF, BCL11B peut aussi réprimer directement la transcription. Cette fonction semble être indépendante des HDACs de classe I et II (insensible à la trichostatine A) mais, dépendante de SIRT1 (Avram et al., 2002; Senawong et al., 2003). BCL11B recrute également d'autres protéines et complexes répresseurs tels que le complexe NuRD via MTA1/2, RbAp46/48 et HDAC1/2 ; le facteur de transcription Sp1, les protéines de l'hétérochromatine HP1 et la méthyltransférase SUV39H1 (Figure 29). Les rôles de ces interactions seront abordés progressivement dans les prochains paragraphes.

De plus, les protéines BCL11 possèdent un motif N-terminal de séquence peptidique MSRRKQ commun à d'autres protéines telles que FOG1, FOG2 et les protéines SALL1 à SALL4 (Figure 29). Les 12 acides aminés N-terminaux comprenant ce motif conservé sont suffisants pour réprimer la transcription grâce au recrutement du complexe NuRD (Lin et al., 2004).

6.3 La variété des rôles des protéines BCL11

6.3.1 « Sœurs rivales » dans le développement du système immunitaire

Les deux protéines BCL11A et BCL11B jouent un rôle très important dans le développement des cellules B et des cellules T, respectivement.

Des souris dont le gène *Bcl11a* a été invalidé (*Bcl11a* $-/-$) présentent un important défaut du développement des cellules B et, dans une moindre mesure des cellules T. L'expression de *Bcl11a* est donc nécessaire au développement des lymphocytes. De plus, la surexpression de *Bcl11a* conduit à l'apparition de lymphomes à cellules B tandis que l'inhibition de *Bcl11a* induit des leucémies à cellules T (Liu et al., 2003). Une étude récente a montré que l'invalidation du gène *Bcl11a* chez une souris adulte induit des défauts d'ordre lymphoïde tels que l'apoptose des cellules B immatures et des cellules progénitrices lymphoïdes conduisant à la perte totale du système immunitaire (Yu et al., 2012).

En ce qui concerne le rôle du gène *Bcl11b* dans le système immunitaire, il code pour un facteur de transcription régulant spécifiquement le développement et la survie des lymphocytes T.

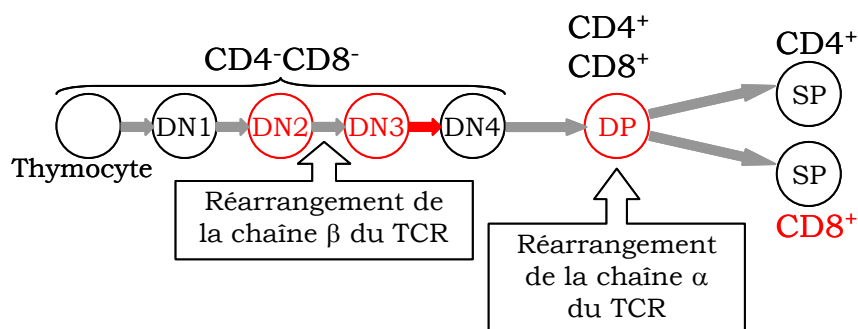


Figure 30 : Schéma simplifié du développement des lymphocytes T à partir des thymocytes, les éléments colorés en rouge sont régulés par Bcl11b (Kominami, 2012).

Au cours du développement du thymus, le thymocyte se différencie, entre autres, en lymphocyte T en progressant par trois stades majeurs en fonction des marqueurs membranaires qu'il exprime. Au départ, la cellule

progénitrice n'exprime ni le CD4, ni le CD8, qui sont tous deux des glycoprotéines membranaires nommées corécepteurs du T-Cell Receptor (TCR). La cellule est donc dans un état double-négatif (DN) : CD4⁻CD8⁻. Puis, elle devient double positive en exprimant les deux marqueurs CD4 et CD8 : CD4⁺CD8⁺. Finalement, la cellule T mature n'exprime qu'un seul corécepteur : soit CD4 pour CD4⁺CD8⁻, soit CD8 pour CD4⁻CD8⁺. La cellule T est alors considérée « SP » pour « Single Positive ». Au cours de cette différenciation, il y a d'abord réarrangement de la chaîne β du TCR des cellules DN puis réarrangement de la chaîne α du TCR des cellules DP (Figure 30) (Kominami, 2012).

Des souris *Bcl11b* ^{-/-} présentent un défaut du développement des lymphocytes T. En revanche, elles possèdent des cellules B normales. De manière plus précise, les thymocytes *Bcl11b* ^{-/-} sont bloqués au stade DN3 dû à un problème de réarrangement de la chaîne β du TCR. De plus, l'apoptose massive des thymocytes provoque la mort des souris *Bcl11b* ^{-/-}, dès le premier jour suivant leur naissance (Wakabayashi et al., 2003b).

Par la suite, un modèle de souris invalidée pour *Bcl11b* spécifiquement dans les thymocytes de manière conditionnelle (CD4-Cre ; *Bcl11b*^{fl^{ox}/fl^{ox}}) a montré que *Bcl11b* est également nécessaire pour la différenciation des cellules DP en cellules SP. Précisément, lorsque la perte d'expression de *Bcl11b* est induite dans les thymocytes au stade DP, les cellules restent bloquées à ce stade et meurent par apoptose (Albu et al., 2007). De plus, dans ces thymocytes (DP) *Bcl11b* ^{-/-}, une étude de transcriptomique a identifié environ 1000 altérations d'expression de gènes dont la surexpression de *ThPOK* et *Runx3*. Les protéines codées par ces deux gènes sont impliquées dans la maturation des thymocytes au stade SP : ThPOK permet la différenciation en CD4⁺ tandis que Runx3 induit la différenciation en CD8⁺. Ce résultat suggère que *Bcl11b* empêche l'expression trop précoce de ces gènes au cours du développement des lymphocytes T (Kastner et al., 2010).

Enfin, trois études indépendantes ont montré que la perte d'expression de *Bcl11b* stoppe la progression des cellules T au stade DN2 et peut induire leur reprogrammation en cellules de type NK (Natural Killer) (Ikawa et al.,

2010; Li et al., 2010c, 2010d). Les lymphocytes NK sont des acteurs de l'immunité innée alors que les lymphocytes T sont des acteurs de l'immunité adaptative.

En résumé, Bcl11b est nécessaire pour le développement précoce des lymphocytes T et pour le maintien de leur identité cellulaire.

6.3.2 BCL11A dans la régulation de l'hémoglobine foétale

Plusieurs études ont également mis en évidence l'implication importante de BCL11A dans la régulation de l'expression de l'hémoglobine foétale (HbF). L'hémoglobine foétale est un tétramère de quatre polypeptides $\alpha_2\gamma_2$, dont deux γ -globine foetales et deux α -globine adultes. Après la naissance, la γ -globine est remplacée par la β -globine afin de former l'hémoglobine adulte (HbA), $\alpha_2\beta_2$: cette étape est nommée la permutation foétale (Figure 31). L'expression d'une β -globine mutée et la non-expression de la β -globine entraînent respectivement, la drépanocytose et la thalassémie β . La réexpression de la γ -globine pourrait compenser le défaut d'expression de la β -globine et semblerait être une excellente thérapie pour ces pathologies (Sankaran and Orkin, 2013).

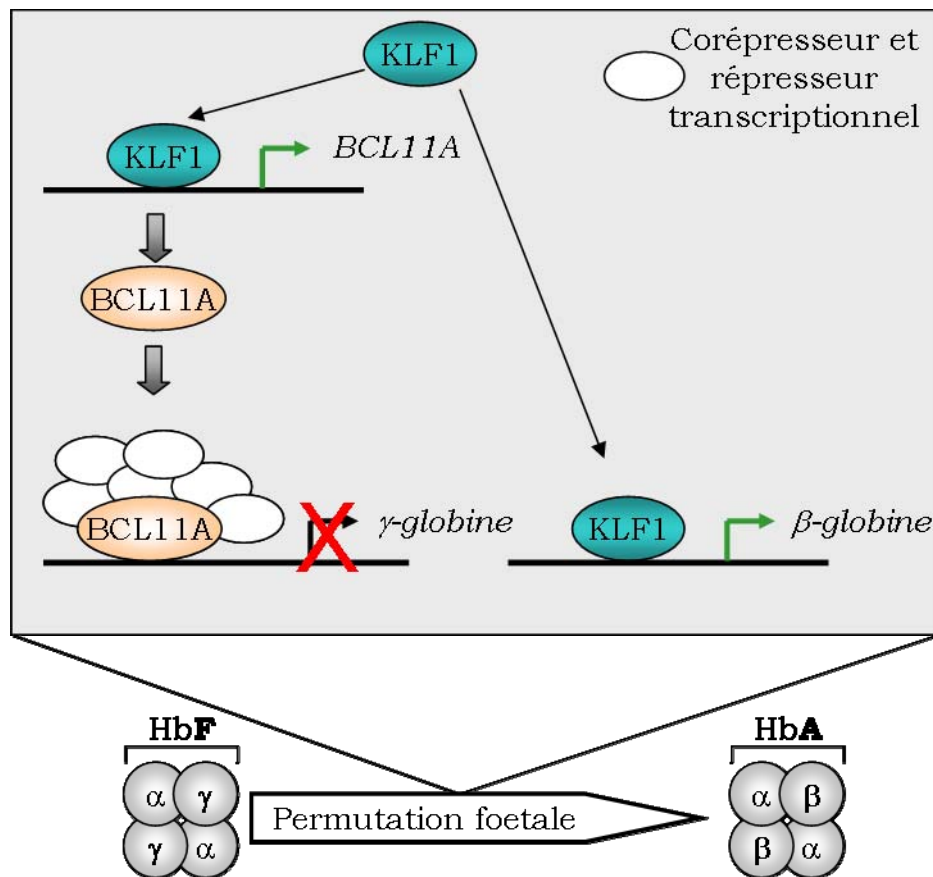


Figure 31 : Implication de BCL11A dans la régulation de l'HbF.

Une première étude a montré que BCL11A associée au complexe NuRD, aux protéines GATA1 et FOG1, réprime le gène de la γ -globine dans des cellules érythroïdes humaines (Sankaran et al., 2008). De même que l'inhibition de l'expression de BCL11A dans ces cellules induit l'expression de l'HbF (Sankaran et al., 2009). De plus, BCL11A coopère aussi avec le facteur de transcription SOX6 pour réprimer l'expression de la γ -globine (Xu et al., 2010). Pour complexifier un peu plus ce modèle, BCL11A recrute également LSD1 et DNMT1 au niveau de la γ -globine pour maintenir la répression transcriptionnelle dans des cellules érythroïdes matures (Xu et al., 2013). En résumé, BCL11A forme un complexe multiprotéique avec plusieurs corépresseurs et répresseurs transcriptionnels pour réprimer la synthèse de l'HbF (Figure 31).

Enfin, le facteur de transcription KLF1 (Krüppel-Like Factor 1) régule directement le gène *BCL11A*. KLF1 contrôle le « switch » des gènes de globines d'une part, en activant directement le gène de la β -globine et d'autre

part, en réprimant indirectement le gène de la γ -globine en induisant l'expression de BCL11A (Figure 31) (Zhou et al., 2010).

6.3.3 *BCL11B* dans le développement des neurones

Bcl11b fut initialement détectée au niveau des projections neuronales de la moelle épinière et plus précisément, au niveau des neurones moteurs corticaux. Un modèle de souris *Bcl11b* *-/-* présente des défauts d'extensions axonales et donc, de connexions entre la moelle épinière et les neurones. Cette étude met en évidence un rôle important de Bcl11b dans le développement des neurones moteurs corticaux (Arlotta et al., 2005).

Chez l'adulte, Bcl11b est également exprimée dans les neurones du striatum et plus précisément, dans les MSNs (GABAergic Medium-sized Spiny Neurons). Le striatum, situé sous le cortex cérébral, permet de contrôler les mouvements et la douleur. La dégénérescence des MSNs entraîne une perte de la motricité et est associée à la maladie de Parkinson et de Huntington. Un modèle de souris déficient pour Bcl11b présente un défaut de différenciation des MSNs responsable de la mauvaise formation du striatum (Arlotta et al., 2008). Récemment, une étude d'immunoprécipitation de la chromatine associée à Bcl11b suivie du séquençage de l'ADN précipité (ChIP-seq) a identifié de nombreux gènes cibles de Bcl11b codant des acteurs de la voie de signalisation BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) dans les cellules striatales. La dérégulation de cette voie de signalisation est impliquée dans la maladie de Parkinson, dans la maladie d'Alzheimer et dans la maladie de Huntington (Tang et al., 2011). Ces études suggèrent donc que Bcl11b joue un rôle important dans le développement du striatum et dans la fonction des MSNs.

Enfin, l'expression de Bcl11b est aussi observée dans les neurones sensoriels de l'organe voméronasal, les VSNs (Vomeronasal Sensory Neurons), situés dans le bulbe olfactif de la souris. L'organe voméronasal permet aux mammifères de détecter les phéromones. Un modèle de souris *Bcl11b* *-/-* développe des VSN normaux mais, ces derniers meurent par

apoptose avant leur maturation (Enomoto et al., 2011). Donc, Bcl11b est également impliqué dans le développement des VSNs.

6.3.4 *BCL11B dans le développement de la peau et des dents*

Enfin, quelques études ont mis en évidence une fonction de Bcl11b dans le développement de la peau, dans le maintien de l'homéostasie de l'épiderme chez l'adulte et dans la formation des dents.

Brièvement, Bcl11b joue un rôle important dans le développement de la peau et plus précisément dans la prolifération et dans la différenciation des kératinocytes ainsi que dans le développement de la barrière épidermale de protection de l'embryon (Golonzhka et al., 2007, 2009a). De plus, Bcl11b régule également l'homéostasie de l'épiderme chez l'adulte (Wang et al., 2012). En ce qui concerne le rôle de Bcl11B dans le développement des dents, les souris *Bcl11b* *-/-* présentent des malformations au niveau des molaires et incisives avec des défauts d'améloblastes qui sont les cellules formant l'émail dentaire (Golonzhka et al., 2009b).

En résumé, les protéines BCL11 possèdent de nombreuses fonctions très variées au cours du développement que ce soit au niveau du système immunitaire, des neurones, de la peau, des dents ou encore de la régulation de l'expression de l'hémoglobine fœtale.

6.3.5 *BCL11B et le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine)*

Jusqu'à ce jour, de nombreuses études ont montré l'implication de BCL11B dans l'établissement et le maintien de la latence virale du VIH dans les lymphocytes T CD4⁺ et dans les cellules microgliales, deux réservoirs cellulaires du virus. Pour cela, BCL11B inhibe la transcription du VIH de deux façons :

- Soit, BCL11B réprime directement la transcription du VIH : en se fixant au niveau des sites SP1 (Specificity Protein 1) de la région promotrice LTR du VIH (Marban et al., 2005). De manière plus précise, BCL11B recrute les désacetylases HDAC1 et HDAC2 ainsi

que la méthylase SUV39H1 (Suppressor of variegation 3-9 homolog family 1) pour mettre en place des marques épigénétiques répressives afin de former l'hétérochromatine en s'associant avec les protéines HP1s (Heterochromatic Protein 1) (Marban et al., 2007). De plus, BCL11B interagit également avec LSD1 pour recruter d'autres méthyltransférases, hSET1 et WDR5 au niveau des sites SP1 du LTR du VIH (Le Douce et al., 2012). De plus, BCL11B recrute également le complexe NuRD pour réprimer la transcription (Cismasiu et al., 2008) (Figure 32).

- Soit, BCL11B réprime le VIH de manière indirecte :
 - D'une part, BCL11B inhibe indirectement la protéine transactivatrice Tat du VIH en la relocalisant dans des structures nucléaires avec HP1 α (Heterochromatin-associated Protein 1 α). Cette relocalisation empêche Tat d'activer la transcription de l'ADN viral (Rohr et al., 2003) (Figure 32).
 - D'autre part, BCL11B associée à la méthylase SUV39H1 et aux HDACs réprime la transcription de *P21* via les protéines SP1 pour empêcher la réplication virale du VIH (Cherrier et al., 2009). En effet, P21 facilite la réplication du VIH en stoppant les cellules dans le cycle cellulaire (Vázquez et al., 2005) (Figure 32).
 - Enfin, une étude récente a montré que BCL11B inhibe l'élongation de la transcription du VIH en inactivant le facteur d'élongation PTEFb (Cherrier et al., 2013; Eilebrecht et al., 2014). Ce dernier est essentiel pour la réplication du VIH (Figure 32).

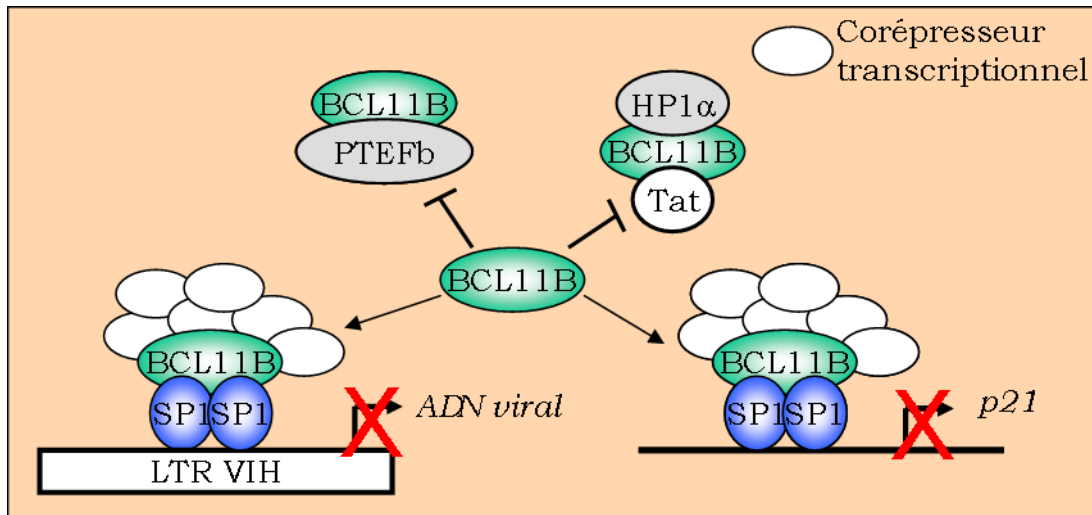


Figure 32 : Schémas récapitulatif des rôles de BCL11B dans la mise en place et la persistance de la latence du VIH

6.3.6 *BCL11A*, oncogène ou gène suppresseur de tumeurs ?

Des souris transplantées avec des cellules de foie fœtal invalidées pour *Bcl11a* (*Bcl11a* $-/-$) meurent d'une leucémie à cellules T où les thymocytes sont remplacés par de gros lymphoblastes (Liu et al., 2003). Cette étude lui confère plutôt un rôle de gène suppresseur de tumeurs.

En revanche, dans les cancers du sein triple-négatif (TNBC, Triple-Negative Breast Cancer), *BCL11A* joue plutôt le rôle d'oncogène. De manière plus précise, la surexpression de BCL11A est observée dans les TNBCs et l'inhibition de son expression diminue le pouvoir tumorigénique des cellules issus des TBNCs (Khaled et al., 2015).

6.3.7 *BCL11B*, un gène suppresseur de tumeurs très particulier

Selon la théorie d'Alfred Knudson, deux événements sont nécessaires pour inactiver un gène suppresseur de tumeurs en provoquant la perte des deux allèles du gène (Knudson, 1971).

BCL11B fait partie des gènes suppresseurs de tumeurs haploinsuffisants, c'est-à-dire que la présence d'un seul allèle fonctionnel n'est pas suffisante pour empêcher la tumorigénèse, et donc que la perte d'un seul allèle peut participer à la tumorigénèse. L'irradiation de souris hétérozygotes *Bcl11b* $+/-$

induit des lymphomes thymiques spontanés par rapport aux souris *Bcl11b* +/+ . De plus, l'inactivation des deux gènes *Bcl11b* et *p53* dans un modèle de souris double hétérozygote, *Bcl11b* +/- *p53* +/-, augmente considérablement l'incidence des lymphomes thymiques spontanés contrairement aux souris *Bcl11b* +/- et aux souris *p53* +/- . Ces résultats suggèrent que la perte d'un allèle de *Bcl11b* associée à de l'irradiation ou à la perte d'un allèle de *p53* favorisent la tumorigénèse du thymus murin (Wakabayashi et al., 2003a). Toutefois, une coopération semble exister entre les gènes *Bcl11b* et *p53*. De plus, BCL11B régule indirectement l'activité de P53 en réprimant l'expression de *MDM2*. Ce gène code pour une ubiquitine ligase responsable de la dégradation de P53 et est activé par P53 lui-même. En effet, il existe une boucle de rétrocontrôle entre P53 et MDM2. Ce résultat suggère que BCL11B participe à la régulation de P53 (Obata et al., 2012). Il s'avère que BCL11A régule également P53 de manière indirecte. En effet, BCL11A se fixe sur le promoteur de *MDM2* pour activer la transcription contrairement à BCL11B qui réprime la transcription (Yu et al., 2012). Donc, BCL11A et BCL11B semblent avoir des rôles opposés dans la régulation de P53.

En ce qui concerne les souris hétérozygotes *Bcl11b* +/- irradiées, la perte d'un allèle de *Bcl11b* augmente l'expansion clonale de thymocytes immatures et stoppe leur différenciation ce qui contribue au développement des lymphomes thymiques (Go et al., 2010, 2013).

Chez l'homme, la plupart des T-ALLs conservent un allèle fonctionnel de *Bcl11b*, le deuxième allèle étant muté au niveau des ZFs impliqués dans la liaison à l'ADN (Gutierrez et al., 2011).

6.3.8 La conservation d'un allèle fonctionnel n'est pas due au hasard !

Comme décrit précédemment, l'apoptose massive des thymocytes est observée dans les souris *Bcl11b* -/- (cf 6.3.1) (Wakabayashi et al., 2003b). D'une part, l'inhibition de l'expression de BCL11B par SiRNA dans des cellules Jurkat induit la mort des cellules par apoptose. Précisément, l'apoptose de ces cellules se déroule en phase S du cycle cellulaire et est, en partie, due à un défaut d'activation de la kinase Chk1 (Cell-cycle checkpoint

kinase 1). Cette kinase Chk1 est activée lors de dommages à l'ADN simple brin au cours de la réplication pour stopper le cycle cellulaire afin de réparer l'ADN (Kamimura et al., 2007). Cette étude suggère donc un rôle de BCL11B dans le maintien de l'intégrité de l'ADN.

D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence le rôle anti-apoptotique des protéines BCL11 dans les cellules cancéreuses. En effet, l'expression de BCL11B est nécessaire à la survie des cellules T issues de leucémies et de lymphomes. L'inhibition de BCL11B par SiRNA dans ces cellules entraîne l'arrêt de la prolifération et l'apoptose contrairement aux lymphocytes T matures qui ne semblent pas être affectés (Grabarczyk et al., 2007; Huang et al., 2011). De plus, l'inhibition de BCL11A par SiRNA dans des lignées issues de lymphomes B induit également l'apoptose des cellules (Gao et al., 2013).

En résumé, les protéines BCL11 semblent être des cibles thérapeutiques prometteuses pour les lymphomes et leucémies.

6.4 Cofacteurs ou facteurs de transcription ?

6.4.1 Découvert en tant que corépresseur...

Les protéines BCL11A et BCL11B ont tout d'abord été identifiées comme agissant en tant que corépresseurs des facteurs de transcription COUP-TF (Avram et al., 2000). Jusqu'à ce jour, le rôle précis du recrutement des protéines BCL11 par les répresseurs transcriptionnels COUP-TF est inconnu.

6.4.2 Puis répresseur transcriptionnel...

Comme décrit précédemment, une étude a identifié la séquence spécifique de liaison à l'ADN des protéines BCL11. En effet, ces dernières peuvent réprimer la transcription de manière indépendante des protéines COUP-TFs mais dépendante de SIRT1 (cf 6.2) (Avram et al., 2002; Senawong et al., 2003).

De plus, BCL11B recrute également le complexe NuRD via les protéines MTA1 et MTA2 dans des lymphocytes T CD4⁺. De manière plus précise, la région N-terminale de BCL11B interagit avec MTA1 et MTA2 pour recruter le complexe NuRD afin de réprimer la transcription (Cismasiu et al., 2005). Dans le contexte neuronal, BCL11B réprime *P57KIP2* en recrutant également le complexe NuRD via l'interaction directe avec les protéines RbAp46/48 (Topark-Ngarm et al., 2006). Dans les lymphocytes T CD4⁺, BCL11B réprime également le promoteur viral du VIH en recrutant le complexe NuRD via les protéines MTA1 (Cismasiu et al., 2008). De même que BCL11A réprime le gène de la γ -globine en recrutant, entre autres, le complexe NuRD (Sankaran et al., 2008). De plus, le recrutement du complexe NuRD au niveau du gène de la γ -globine résulte de l'interaction entre la protéine MTA2 et la partie N-terminale de BCL11A (Figure 33) (Xu et al., 2010).

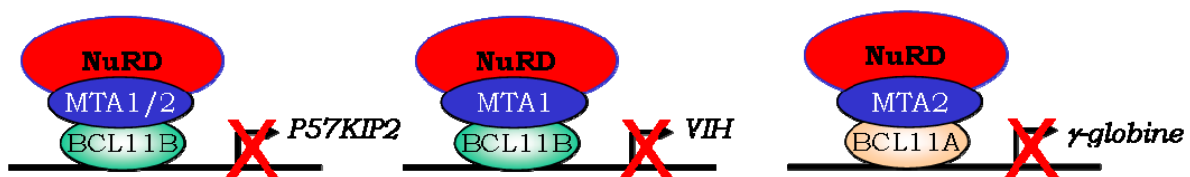


Figure 33 : Rôle de répresseur transcriptionnel de BCL11B

6.4.3 Et activateur transcriptionnel...

Outre son rôle de répresseur transcriptionnel, BCL11B peut également activer la transcription et notamment dans les lymphocytes T CD4⁺ activés. De manière précise, BCL11B active directement et indirectement la transcription du gène de l'IL2 suite à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ :

- D'une part, BCL11B se fixe directement sur le promoteur de l'IL2 afin de recruter l'acétyltransférase P300 pour activer la transcription (Figure 34) (Cismasiu et al., 2006).
- D'autre part, BCL11B favorise l'activation de NF- κ B en activant l'expression de la kinase Cot qui est responsable de la régulation de l'inhibiteur I κ B de la voie NF- κ B. L'IL2 étant un gène cible de la voie

NF- κ B, BCL11B participe indirectement à l'induction de son expression (Figure 34) (Cismasiu et al., 2009).



Figure 34 : Rôle d'activateur transcriptionnel de BCL11B

6.4.4 Ou encore régulateur bimodal.

Récemment, l'étude de la fonction de Bcl11B dans des thymocytes murins, a mis en évidence une cascade de MPTs régulant l'activité transcriptionnel de Bcl11b au niveau du gène de l'*Id2*. Précisément, dans des thymocytes murins naïfs, Bcl11b réprime l'expression d'*Id2* en recrutant le complexe NuRD. Suite à l'activation des thymocytes mimant leur différenciation, Bcl11b est rapidement hyperphosphorylée par la voie des MAPK puis déSUMOylée avant d'être déphosphorylée et reSUMOylée et, enfin, ubiquitinylée pour être dégradée par le protéasome. La reSUMOylation de Bcl11B est l'étape permettant de recruter le coactivateur P300 au niveau du promoteur de l'*Id2* pour activer la transcription. En résumé, la conséquence de ces MPTs au niveau de Bcl11B permet le passage d'un état de répresseur transcriptionnel vers un activateur transcriptionnel (Figure 35) (Zhang et al., 2012b).



Figure 35 : BCL11B, régulateur bimodal dans les thymocytes murins

6.4.5 *BCL11* et *BCL6*

Lors de la découverte de Bcl11a chez la souris, nommée alors Evi9, l'étude a mis en évidence l'existence de trois isoformes : Evi9a, contenant deux ZFs de type C₂H₂ ; Evi9b dont le 1^{er} ZF est absent et Evi9c dont le second ZF manque. L'analyse de localisation subcellulaire de ces trois variants a révélé qu'Evi9a et Evi9b sont nucléaires contrairement à Evi9c qui est plutôt cytoplasmique. De plus, Evi9a et Evi9b forment des structures nucléaires particulières non caractérisées en foyers comme BCL6. Ces deux isoformes interagissent avec BCL6 et de manière plus précise, leur 2^{ème} ZF interagit avec le domaine BTB/POZ de BCL6 (Nakamura et al., 2000). Chez l'homme, BCL11A-XL et BCL11A-L interagissent également avec BCL6 et sont localisées au sein des mêmes structures sous-nucléaires. En revanche, ces interactions n'affectent ni l'activité transcriptionnelle de BCL11A ni celle de BCL6 (Liu et al., 2006). De plus, la SUMOylation d'une lysine de BCL11A située en région C-terminale ne module pas l'interaction avec BCL6 (Kuwata and Nakamura, 2008). Jusqu'à ce jour, aucun rôle n'a été mis en évidence pour cette interaction.

HYPOTHESES DE TRAVAIL

La famille des protéines MTA (Metastasis Tumor Antigen) compte trois membres MTA1, 2 et 3 qui diffèrent principalement au niveau de leur extrémité C-terminale. Cette région C-terminale est complètement désorganisée et aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié. Cependant, elle est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) qui modulent l'interaction avec de nombreux partenaires. En revanche, la région N-terminale est conservée parmi ces protéines et est organisée en quatre domaines fonctionnels impliqués dans l'interaction avec le complexe NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase complex) (Figure 36) (Manavathi, 2007).

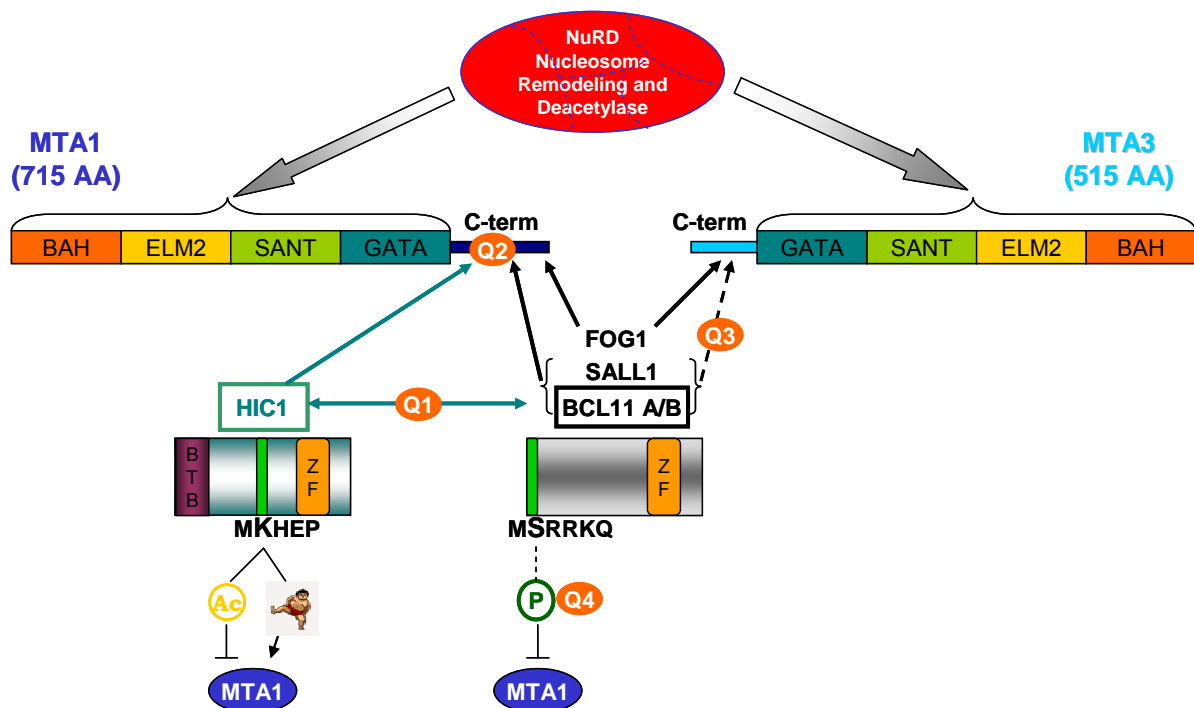


Figure 36 : Schéma représentant l'extrémité C-terminale des protéines MTA comme plateforme d'interactions liant les MPTs des régulateurs transcriptionnels au recrutement du complexe NuRD

Les facteurs de transcription HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) et BCL11 (B-Cell Leukemia 11) recrutent le complexe NuRD grâce à une interaction avec les protéines MTA (Figure 36). Un crible double-hybride réalisé avec les régions BTB-RC de HIC1 comme appât, a permis d'isoler d'une part, l'extrémité C-terminale de MTA1 (Van Rechem et al., 2010) et d'autre part, la région C-terminale de BCL11A (Résultats non publiés). L'interaction HIC1-BCL11A a été validée par des expériences de co-immunoprécipitation après transfection transitoire (Van Rechem, Thèse de Doctorat, Université de Lille 2009). Au cours de ma Thèse, nous avons successivement abordé les questions suivantes.

Question 1 : Comment ces deux protéines endogènes, HIC1 et BCL11A, interagissent-elles et quelles sont les conséquences fonctionnelles de ces interactions? (Q1, Figure 36)

De plus, le domaine isolé de BCL11A étant fortement conservé avec son paralogue BCL11B, nous avons supposé que HIC1 pourrait interagir également avec BCL11B. En effet, les patrons d'expression de HIC1 et de BCL11B au cours du développement embryonnaire chez la souris suggèrent une co-expression forte au niveau du thymus (Grimm et al., 1999; Leid et al., 2004)

Puis, nous nous sommes intéressés aux modalités d'interaction entre les protéines HIC1 et BCL11 en lien avec le complexe NuRD, c'est-à-dire :

Question 2 : Ces protéines interagissant toutes deux avec MTA1, forment-elles un complexe ternaire dans le cadre d'une régulation synergique de gènes cibles communs ? (Q2, Figure 36)

Au sein des régulateurs transcriptionnels HIC1 et BCL11, de courts motifs peptidiques conservés interagissent avec les extrémités C-terminales des MTAs et des MPTs au niveau de ces motifs peptidiques régulent ces interactions (Figure 36). Contrairement à HIC1 qui possède un motif à exemplaire unique d'interaction avec les protéines MTA1, BCL11 appartient à une famille de cofacteurs dont FOG1 et SALL1, caractérisée par un motif N-terminal conservé de séquence MSRRKQ, interagissant avec les protéines

MTA1 et MTA3 (Lin et al., 2004). L'interaction entre HIC1 et MTA1 est régulée par une balance Acétylation/SUMOylation, l'acétylation l'inhibe alors que la SUMOylation la favorise (Van Rechem et al., 2010). En ce qui concerne BCL11, des études ont montré qu'il interagit avec MTA1 par sa région N-terminale contenant le motif MSRRKQ (Cismasiu et al., 2005). Dans le cas de FOG, ce motif permet l'interaction non seulement avec MTA1 mais aussi avec MTA3 (Roche et al., 2008). De plus, dans le cas de SALL1, l'interaction avec MTA1 est inhibée par la phosphorylation de la sérine 2 du motif MSRRKQ (Lauberth et al., 2007). Nous nous sommes donc demandés s'il en était de même pour les protéines BCL11, c'est-à-dire :

Question 3 : Est-ce que les protéines BCL11 qui interagissent avec MTA1, peuvent également interagir avec MTA3 tout comme FOG ?

Question 4 : Est-ce que la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11 existe et régule l'interaction avec les protéines MTA et si oui, dans quel contexte physiologique ? (Q3-Q4, Figure 36)

Enfin, le gène suppresseur de tumeurs *HIC1* codant un facteur de transcription, une partie de mon travail de Thèse a porté sur la validation de nouveaux gènes cibles de HIC1 identifiés lors d'études transcriptomiques réalisées au préalable dans l'équipe (Van Rechem et al., 2009a). L'identification de nouveaux gènes cibles de HIC1 doit permettre de comprendre son rôle au cours du développement et les implications de son extinction dans les cancers. Au cours de ma Thèse, j'ai pu mettre en évidence trois nouveaux gènes cibles directs de HIC1 dont ApoER2 et *VLDLR*.

RESULTATS

L'article concernant l'étude de l'interaction HIC1-BCL11 a été placé en tant que publication n°2 étant moins abouti que l'étude de l'interaction BCL11-MTA. En effet, des difficultés ont été rencontrées au cours de cette étude avec dans un premier temps, la recherche d'un modèle cellulaire exprimant les protéines endogènes HIC1 et BCL11B et, dans un second temps, la validation de l'interaction entre ces protéines endogènes qui n'a été obtenue que très récemment.

1 Publication n°1

PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4⁺ T cell activation.

En révision majeure à Molecular and Cellular Biology

Marion Dubuissez, Ingrid Loison, Sonia Paget, Han Vorng, Saliha Aityahia, Olivier Rohr, Anne Tsicopoulos and Dominique Leprince

La version de l'article soumise à MCB est insérée suite à cette page de présentation. Puis, la version révisée des figures est décrite à l'état actuel.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

“PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4⁺ T cell activation”

**Marion Dubuissez¹, Ingrid Loison¹, Han Vorng², Olivier Rohr³, Anne Tsicopoulos²
and Dominique Leprince^{1,*}**

(1) Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR8161, (2) Centre d’Infection et d’Immunité de Lille, INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Institut PASTEUR de Lille, Université de Lille, Lille, France, (3) Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, EA7292, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

* Corresponding author. Dominique Leprince, Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR8161 1, rue du Pr. Calmette, CS 50447, 59021 Lille Cedex, France.
E mail : dominique.leprince@ibl.cnrs.fr; Phone : +33 3 20 87 11 19. Fax : +33 3 20 87 11 11

Key Words: BCL11B, NuRD chromatin remodeling complexes, PKC, CD4⁺ T cell activation, Phosphorylation, SUMOylation, IL2, Id2

Running title PKC switches BCL11B to an activator in CD4⁺ T cells

Number of characters (excluding spaces): 39887.

25 **Abstract**

26

27 The transcription factor BCL11B/CTIP2 is a major regulatory protein implicated in various
28 aspects of development, function and survival of T cells. MAPK-mediated phosphorylation
29 and SUMOylation modulate BCL11B transcriptional activity, switching it from a repressor in
30 naïve murine thymocytes to a transcriptional activator in activated thymocytes. Here, we
31 show that BCL11B interacts via its conserved N-terminal MSRRKQ motif with endogenous
32 MTA1 and MTA3 proteins to recruit various NuRD complexes. Furthermore, we demonstrate
33 that PKC-mediated phosphorylation of BCL11B Serine 2 has no impact on BCL11B
34 SUMOylation but negatively regulates NuRD recruitment by dampening the interaction with
35 MTA proteins. A newly obtained phosphospecific antibody detected an increased
36 phosphorylation of BCL11B Serine 2 upon *in vivo* activation of transformed and primary
37 human CD4⁺ T cells. In addition, through RT-qPCR and ChIP analyses, we show that
38 following activation of CD4⁺ T cells, BCL11B still binds to *IL2* and *Id2* promoters but
39 activates their transcription by recruiting P300 instead of MTA1.

40 Our results unveil Serine 2 phosphorylation as a new BCL11B post-translational modification
41 linking PKC signalling pathway to TCR activation and define a simple model for the
42 functional switch of BCL11B from a transcriptional repressor to an activator during TCR
43 activation of human CD4⁺ T cells.

44

45 INTRODUCTION

46

47 Modulation of the chromatin landscape through nucleosome remodelling and covalent
48 modifications of histone tails is a fundamental mechanism regulating gene transcription in
49 eukaryotes. This mechanism relies on complex relationships between sequence-specific
50 transcription factors and chromatin remodelling complexes such as NuRD (Nucleosome
51 remodelling and deacetylase). Post translational modifications (PTMs) of these two types of
52 transcription regulatory proteins allow integrating various signalling and environmental cues
53 into highly dynamic and controlled responses, thereby achieving coordinated gene expression
54 programs essential for cell proliferation or differentiation.

55 BCL11B, also known as CTIP2, a transcription factor binding DNA directly through two
56 centrally located C₂H₂ zinc fingers motifs was independently isolated as an interacting partner
57 of COUP-TF in neurons and as a tumour suppressor gene in mouse models of γ -ray induced
58 thymic lymphomas (1-3). However, besides its expression in the CNS, BCL11B was later
59 shown to be widely expressed in all T-cell subsets, starting from the DN2 stage and to be
60 involved in various aspects of development, function and survival of T-cells (4). Indeed,
61 starting with the characterization of Bcl11b knock-out mice, a plethora of studies have
62 defined BCL11B as the focal point essential for several checkpoints involved in T-cell
63 commitment in early progenitors, selection at the DN2 stage and differentiation of peripheral
64 T cells (5-9). On line with these crucial roles in normal T cells, monoallelic BCL11B
65 deletions or missense mutations disrupting the two zinc fingers involved in sequence-specific
66 DNA-binding have been identified in the major molecular subtypes of T-cell acute
67 lymphoblastic leukaemia (10). Therefore, these observations together with the occurrence of
68 deletions and mutations in γ -ray induced thymomas in mice identify BCL11B as a
69 haploinsufficient tumor suppressor gene (11).

70 BCL11B is essential for T-cell development and is considered as a “guardian of T cell fate”
71 (12). Its closely related paralog BCL11A is essential for normal lymphopoiesis and
72 haemoglobin switching during erythroid differentiation (13, 15). These two transcription
73 factors appear thus as key regulators of fundamental differentiation programs during normal
74 hematopoiesis.

75 BCL11B represses transcription of its targets genes through interaction with several
76 chromatin remodelling complexes and notably recruits NuRD complexes via interaction with
77 MTA1 and MTA2 (4, 11, 16-18). Albeit, originally characterized as a sequence-specific
78 transcriptional repressor, BCL11B also behaves as a context-dependent transcriptional
79 activator, notably for the *IL2* and *Cot kinase* genes in CD4⁺ T-cell activation (19, 20).

80 The molecular mechanisms underpinning this dual behaviour of BCL11B as a transcriptional
81 repressor and activator are not fully deciphered but clearly rely on a dynamic cross-talk
82 between BCL11B PTMs. Indeed, mass spectrometry analyses of thymocytes isolated from 4-8
83 week-old mice and stimulated with a mixture of phorbol ester and calcium ionophore used as
84 an *in vitro* model mimicking TCR activation identified several MAPK phosphorylation sites
85 of Bcl11b and confirmed its SUMOylation on Lysine 679 (21). These phosphorylation events
86 then initiate a rapid and complex cycle of Bcl11b PTMs including deSUMOylation,
87 rephosphorylation and reSUMOylation allowing recruitment of the transcriptional coactivator
88 P300 to activate *Id2* transcription (21, 22).

89 Here, we found that BCL11B interacts with the three MTA family members through its
90 conserved N-terminal MSRRKQ motif which is embedded in a potential PKC
91 phosphorylation consensus site. We demonstrated that a S2D phosphomimetic point mutation
92 is sufficient to abolish the interaction of BCL11B with all MTA corepressors and hence with a
93 wide range of NuRD complexes. Through generation of phosphospecific antibodies, we
94 identified *in vivo* Serine 2 phosphorylation of endogenous BCL11B proteins. We found that

95 activation of transformed Jurkat or primary human CD4⁺ T-cells results in a rapid and
96 transient PKC-induced phosphorylation of this BCL11B Serine 2 culminating at 30 minutes
97 of treatment. In contrast with the MAPK-induced phosphorylations, this PKC phosphorylation
98 peak coincides with and does not impact on the SUMOylation peak. As shown by co-
99 immunoprecipitation of endogenous proteins and chromatin immunoprecipitation (ChIP)
100 experiments, this BCL11B Serine 2 phosphorylation through a decreased interaction with
101 MTA1 and a concomitant increased interaction with P300 participates to a strong
102 transcriptional up-regulation of *Id2* and *IL2*, two BCL11B direct target genes, during CD4⁺ T
103 cell activation. Thus, our findings identify BCL11B Serine 2 phosphorylation as a new
104 mandatory step in the interconnected post-translational modifications converting BCL11B
105 from a transcriptional repressor to an activator and provide compelling evidence that together
106 with SUMOylation this PKC-mediated phosphorylation is essential for transcriptional
107 activation of *IL2* during human CD4⁺ T-cell activation.

108

109 **MATERIALS AND METHODS**

110

111 **Cell culture**

112 HEK293T cells were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 10% FCS, non
113 essential amino acids and gentamycin. Jurkat and MOLT4 cells were maintained in RPMI
114 1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS, non essential amino acids and
115 penicillin/streptomycin.

116

117 **Isolation and activation of human T CD4⁺ lymphocytes.**

118 Donor blood was provided by Etablissement Français du Sang – Nord de France (EFS), in
119 agreement with the official ethics statement between EFS and the Centre National de la
120 Recherche Scientifique (CNRS) – Délégation Nord Pas-de-Calais et Picardie. The study was
121 approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and EFS Institutional Review Board,
122 and informed consent was obtained in writing for each donor. Isolation of human CD4⁺ T
123 cells was performed as previously described (23). Briefly, human peripheral blood
124 mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation
125 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and CD4⁺ T cells were obtained by
126 negative selection using CD4⁺ T Cell Isolation Kit II according to the manufacturer's
127 instructions (Miltenyi Biotech). The purity was determined by flow cytometry, and was
128 always $\geq 95\%$. CD4⁺ cells (10^6 cells/mL) were cultured in complete RPMI medium (RPMI
129 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco),
130 2mM L-glutamine) and stimulated or not in 96-well flat-bottomed microculture plates coated
131 with anti-CD3 antibodies (10 μ g/ml, OKT3 clone) and soluble anti-CD28 (2 μ g/ml; BD
132 Biosciences) for 24hr or with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA 50ng/mL) and

133 ionomycin (1µg/mL) for 5 hours. Cells were then recovered by centrifugation for further
134 analyses.

135

136 **Plasmids and chemicals**

137 The MTA1, MTA3 and BCL11A expression vectors were kind gifts of Drs R. Kumar, P.
138 Wade and P. Tucker, respectively. The various FLAG BCL11B expression constructs used in
139 this study were generated as follows. We PCR amplified and cloned a fragment corresponding
140 to amino acids 1-20 and 1-58 of BCL11B into pSG5-Gal4-NLS-HA. The deletion mutants of
141 BCL11B were PCR amplified from pcDNA3-FLAG-BCL11B wild-type plasmid with
142 relevant oligonucleotides and subcloned in pcDNA3-FLAG-BCL11B using standard
143 procedures (17, 24). All constructs were verified by sequencing. PMA and Ionomycin, as well
144 as Bisindolylmaleimide II (BIM II) and Gö6983, two general inhibitors of all protein kinase C
145 (PKC) subtypes were purchased from Sigma-Aldrich (25-27). The MEK inhibitor U0126 was
146 purchased from Merck Millipore.

147

148 **Transfection, immunoprecipitation and co-immunoprecipitation**

149 Cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the PEI method using ExGen 500
150 (Euromedex), as previously described with 2.5 µg of DNA. Cells were transfected for 6h and
151 then incubated in fresh complete medium. After 48h transfection, cells were rinsed with ice
152 PBS and lysed in cold IPH buffer (50mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40,
153 protease inhibitor cocktail (Roche)) for co-immunoprecipitation. Cell lysates were sonicated
154 briefly and cleared by centrifugation (14 000 rpm, 4°C, 15 min). The supernatants were pre-
155 cleared with 15 µl of protein A/G sepharose beads (Amersham Bioscience) incubating during
156 1 hour on a rotator at 4°C. Then, lysates were incubated with 2 µg of antibody on a rotator at
157 4°C overnight. Later, 20 µl of protein A/G beads were added and incubated 30 min at 4°C.

158 Finally, the beads were washed three times with IPH buffer. Bound proteins were eluted by
159 boiling in Laemmli buffer (28).

160 To detect endogenous interactions, we first performed a nuclear proteins enrichment step,
161 followed by co-immunoprecipitation assays (28).

162

163 **Transfection and luciferase transactivation test**

164 Cells were plated in 12-well plates Cell Bind (Corning) and transfected with 500 ng of DNA.

165 Cells were transfected for 6h and then incubated in fresh complete medium. After 48h
166 transfection, cells were rinsed with ice PBS and lysed in the Luc assay buffer. Luciferase and
167 β -galactosidase activities were measured using respectively beetle luciferin (Promega) and the
168 Galacto-Light kit (Tropix) with a Berthold chemiluminometer (28).

169

170 **Antibodies and Western Blot analyses**

171 To generate polyclonal antibodies against Phosphorylated-Serine 2 of BCL11B, control and
172 phosphorylated peptides corresponding to AA 1-19 of human BCL11B (H2N-
173 MS(PO3H2)RRKQGNPQHLC-CONH2) peptide were synthesized, coupled to KLH and used
174 to immunize rabbit (Eurogentec, Belgium). Control and phosphospecific antibodies were
175 purified by affinity chromatography using standard protocols. Commercial antibodies of the
176 following specificity were used: FLAG M2 from Sigma, HA from BABCO, BCL11B
177 (ab18465 for Western Blot and ab28448 for ChIP from Abcam), Phospho-Erk1/2 (9106 from
178 Cell Signaling); Actin, MTA1 and MTA3 from Santa Cruz. Anti phosphor-Ser/Thr (Pro-
179 MPM2) is from Cell Signaling.

180 Western blots were performed as previously described (29). The secondary antibodies were
181 horseradish peroxidase-linked antibodies against rabbit, rat and mouse immunoglobulins
182 (Amersham Biosciences); goat immunoglobulins (Southern Biotech).

183 **Chromatin Immunoprecipitation**

184 Jurkat and primary human CD4⁺ T-cells were washed with PBS and resuspended in 0.5 ml
185 PBS for 5x10⁶ cells. Then, cells were fixed by adding formaldehyde to a final concentration
186 of 1% for 8 min at room temperature. To stop fixation, glycine was added to a final
187 concentration of 0.125M. After 5 min at room temperature, cells were collected by
188 centrifugation (1500 rpm, at 4°C, 5 min). The supernatants were removed and we lysed cells
189 by resuspension in chilled cell lysis buffer for 10 min on a rotator at 4°C. Then, the samples
190 were pelleted, resuspended in 200 µl nuclei lysis buffer and sonicated to chromatin with an
191 average size of 250 bp using a cooling BioRuptor (Diagenode, Belgium). 20 µg of chromatin
192 was immunoprecipitated with indicated antibodies and real-time PCR analyses were
193 performed as described (28). The primers used are summarized in Table 1.

194

195 **RT and Quantitative PCR**

196 Total RNAs were reverse transcribed using random primers and MultiScribe™ reverse
197 transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR analyses were performed by Power SYBR
198 green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene)
199 according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to 18S RNA used as
200 internal control. The primers used are summarized in Table 2.

201

202 **Statistics**

203 Experiments were realised at least twice independently in duplicates or triplicates. Statistical
204 analyses were performed by Student's test. The asterisk (*) indicates $p < 0.05$, (**) indicates p
205 < 0.01 and (***) indicates $p < 0.001$.

206

207 **RESULTS**

208

209 **BCL11B interacts with the three MTA family members**

210 Three corepressors MTA1, MTA2 or MTA3 are found in a mutually exclusive manner in
211 different NuRD complexes thereby contributing to different specialized functions for these
212 highly heterogeneous chromatin remodelling complexes (30, 31). BCL11B recruits NuRD
213 complexes via interaction with the closely related MTA1 and MTA2 proteins (18). We thus
214 investigated if BCL11B also interacts with the functionally distinct MTA3 protein. Firstly, we
215 reproduced the interaction between BCL11B and MTA1 by co-immunoprecipitation
216 experiments in transiently transfected HEK293T (Figure 1A) and further showed that
217 BCL11B was coprecipitated by MTA3 (Fig. 1B). Furthermore, we detected an interaction
218 between BCL11B and MTA1 or MTA3 endogenous proteins in the human acute
219 lymphoblastic leukemia cell line, MOLT4 (Fig. 1C-D) and in the human CD4⁺ T-cell line
220 Jurkat (Supplemental Fig. 1A-B) [20]. MOLT4, in contrast with Jurkat cells, expresses both
221 BCL11B and its close homolog BCL11A (Supplemental Fig. 1C-F) (32, 33). Similarly, we
222 unravelled an interaction between BCL11A and MTA1 or MTA3 proteins either
223 overexpressed in HEK 293T cells (Supplemental Fig. 1G-H) or endogenous in MOLT4 cells
224 (Fig. 1E-F). Taken together, these results demonstrate that BCL11B and BCL11A can interact
225 with the MTA1/MTA2 and MTA3 proteins and hence with a wide variety of NuRD
226 complexes.

227

228 **Phosphomimetic mutation S2D disrupts the interaction with MTA proteins and relieves** 229 **the transcriptional repression activity of the BCL11B N-terminal domain**

230 FOG, a co-factor of the GATA transcription factor essential for erythropoiesis and
231 megakaryopoiesis *in vivo* and the developmental regulator SALL1 share with BCL11B a N-

232 terminal highly conserved motif, MSRRKQ (25, 34, 35). Moreover, the first 45 amino acids
233 of BCL11B are sufficient for the interaction with MTA1 in GST pull-down experiments (18).
234 To assess this interaction *in vivo*, we fused the first 20 or 58 amino acids of BCL11B, in
235 frame with a C-terminal Gal4 DNA-binding domain into the pSG5-Gal4-NLS-HA eukaryotic
236 expression vector to mimic their location in the full-length protein and to avoid
237 conformational effects (Fig. 2A) (36). Transient transfection assays demonstrated that the 1-
238 20- and the 1-58-BCL11B-Gal4 chimeras are nuclear (Supplemental Fig. 2A) and interact
239 with MTA1 (Fig. 2B) and MTA3 (Fig. 2C). Consistent with these results, we showed that in
240 luciferase reporter assays, the 1-20 and 1-58 BCL11B-Gal4 constructs mediate strong
241 transcriptional repression (Figure 2D). Thus, the first 20 amino acids of BCL11B, including
242 the conserved MSRRKQ motif have autonomous repression activity and are sufficient to
243 interact with MTA1 and MTA3.

244 As previously shown, Serine 2 (Ser2) of the conserved MSRRKQ motif is embedded in a
245 potential consensus site (S/T-X₂₋₀-R/K₁₋₃) for phosphorylation by protein kinase C (PKC), a
246 family of Serine/Threonine kinases involved in many cellular functions, including T-cell
247 activation (26, 37-39). To study the potential effect of Ser2 phosphorylation, we engineered a
248 phosphomimetic point mutant S2D, substituting Serine 2 by an Aspartic acid in the 1-20
249 BCL11B-Gal4 construct (Fig. 2A). Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that
250 this S2D mutant was unable to co-immunoprecipitate MTA1 or MTA3 (Fig. 2B-C). On line
251 with these results, the repression activity of the 1-20 BCL11B-Gal4 construct is partially
252 relieved by the S2D point mutation (Fig. 2E).

253 Collectively, our results demonstrate that BCL11B Ser2 phosphorylation in the isolated N-
254 terminal repression motif abolishes its interaction with MTA1 or MTA3 and hence severely
255 impairs its transcriptional repression potential.

256

257 **BCL11B Ser2 phosphorylation impedes NuRD recruitment by disrupting interaction**
258 **with MTA proteins**

259 To further examine the role of BCL11B Ser2 phosphorylation in governing BCL11B function,
260 we next created two full-length BCL11B point mutants, a phosphomimetic S2D and a
261 phosphodeficient S2A mutant and a deletion mutant lacking the conserved N-terminal motif,
262 BCL11B- Δ MSRRKQ (Fig. 3A), all displaying a nuclear localization (Supplementary Figure
263 2B). In co-immunoprecipitation experiments, the S2D and Δ MSRRKQ mutants did not
264 interact with MTA1 or MTA3 (Fig. 3B-C-D). Furthermore, the BCL11B S2A mutant still
265 weakly interacts with endogenous MTA1 proteins whereas the BCL11B S2D and Δ MSRRKQ
266 deletion mutants are unable to do so (Fig. 3E). Indeed, the S2A mutation did not abolish the
267 repression potential of a 1-12 FOG1-Gal4 chimera (34). To address the recruitment of
268 endogenous NuRD complexes, wild-type and S2D BCL11B were overexpressed in HEK293T
269 and immunoprecipitated with anti-FLAG. Western blot analyses of the immunoprecipitates
270 demonstrated that the NuRD components CHD4, MTA1, HDAC2 and RbAp46 were less
271 efficiently co-precipitated by the S2D mutant than by BCL11B (Fig. 3F). Thus, the N-
272 terminal motif MSRRKQ of BCL11B is both necessary and sufficient to interact with MTA1
273 and MTA3 proteins and Ser2 phosphorylation negatively regulates these interactions with
274 MTA1/MTA3 and other NuRD core components.

275

276 **BCL11B Ser2 is phosphorylated *in vivo* by PKC upon PMA-Ionomycin activation of**
277 **Jurkat cells**

278 Recently, tandem mass spectrometry analyses of murine thymocytes stimulated with a
279 mixture of Phorbol 12, 13-dibutyrate and A23187 (P/A), identified several phosphorylation
280 sites of Bcl11b but not Ser2 which was absent of the Bcl11b-specific peptide coverage map
281 (21). To detect *in vivo* phosphorylation of endogenous BCL11B proteins on Ser2, we first

282 obtained purified rabbit polyclonal antibodies, anti Phospho-Ser2 BCL11B, specifically
283 recognizing the phosphorylated Serine 2 residue in BCL11B upon transient transfection in
284 HEK293T cells and treatment for 20 minutes with 1 μ M PMA (Phorbol-12-Myristate-13-
285 Acetate), a highly potent PKC activator (Fig. 4A) (39). To demonstrate the specificity of this
286 antibody, HEK293T cells were transfected with wild-type BCL11B or phosphodeficient
287 BCL11B S2A and treated for 20 minutes with 1 μ M PMA. Western blot analyses detected a
288 strong induction of BCL11B Ser2 phosphorylation, as gauged by the anti Phospho-Ser2
289 BCL11B antibodies, in PMA-treated cells transfected with wild-type but not with BCL11B
290 S2A (Fig. 4B). Finally, addition of BIMII a potent inhibitor of all PKC subtypes severely
291 decreased BCL11B phosphorylation on Serine 2 (Fig. 4C). When HEK293T cells transfected
292 with FLAG-BCL11B were treated with DMSO or 1 μ M PMA for various times, a rapid and
293 transient phosphorylation of Ser2 was detected with a peak after 5 minutes of PMA treatment
294 (Fig. 4D). Notably, this Ser2 phosphorylation peak preceded the SUMOylation of BCL11B
295 which reached a maximum after ca. 40 minutes of PMA treatment. In addition, the PKC
296 inhibitor BIMII had no effects on BCL11B SUMOylation level in contrast with the ERK
297 inhibitor U0126 which severely depleted it (Fig. 4E), as previously shown in murine
298 thymocytes (21, 40).

299 We next addressed this BCL11B Ser2 phosphorylation *in vivo*, during human CD4⁺ T-cell
300 activation. Western blot analyses of PMA-Ionomycin-treated Jurkat cells with the anti
301 Phospho-Ser2 BCL11B specific serum confirmed phosphorylation of Ser2 in BCL11B at the
302 endogenous level at 30-60 minutes of activation (Fig. 5A). This transient phosphorylation
303 peak nicely coincides with the appearance of SUMOylated BCL11B (Fig. 5A-C). In addition,
304 using two different anti phospho Serine/Threonine antibodies (pSer/Thr) we failed to detect in
305 human Jurkat cells the rapid phosphorylation (5 min.) of BCL11B observed in 4-8 weeks
306 murine thymocytes treated with P/A (Fig. 5A, data not shown) (21). In addition, P/A

307 treatment of murine thymocytes ultimately results in the ubiquitination and degradation of
308 Bcl11b (21). However, whereas prolonged stimulation of Jurkat cells with PMA-Ionomycin
309 also resulted in a decrease of BCL11B protein levels after 2 hours, this correlated with
310 transcriptional repression of *BCL11B* rather than degradation after ubiquitination (Fig. 5A-D).
311 These data identify phosphorylation of BCL11B Serine 2 by PKC as a new post-translational
312 modification of BCL11B during human T-cell activation, acting independently of its
313 SUMOylation.

314

315 **Endogenous BCL11B binds the *IL2* and *Id2* promoters but with the MTA1 co-repressor**
316 **or the P300 co-activator in resting versus PMA-Ionomycin activated Jurkat T cells**

317 Taken together, our results demonstrate that upon PMA-Ionomycin activation of Jurkat cells,
318 BCL11B is phosphorylated by PKC on Serine 2 in its N-terminal repression motif and
319 becomes thus unable to interact with the MTA1 and MTA3 co-repressors (Fig. 3, 4 and 5).
320 BCL11B participates through interaction with the P300 co-activator in the transcriptional
321 activation of *IL2* in PMA-Ionomycin activated human Jurkat cells and of *Id2* in P/A-treated
322 murine thymocytes (20, 21). Activation of Jurkat cells with PMA-Ionomycin induced a huge
323 up-regulation of *IL2* gene expression starting as early as 30 minutes of treatment and a
324 significant, albeit slightly delayed up-regulation of *Id2* around 60 minutes (Fig. 6A-B and
325 Supplemental Fig. 3A), whereas *BCL11B* mRNA levels decreased after 2 hours of treatment
326 (Fig. 5D). Co-immunoprecipitation of BCL11B with MTA1 or P300 endogenous proteins in
327 Jurkat cells treated for 30 minutes with PMA-Ionomycin demonstrated that the peak of
328 BCL11B Ser2 phosphorylation, we reproducibly observed (Fig. 5A), is concomitant with an
329 increase of BCL11B-P300 interaction and a reciprocal decrease of BCL11B-MTA1
330 interaction (Fig. 6C).

331 We next performed quantitative ChIP assays to correlate these co-immunoprecipitation
332 experiments and transcriptional outputs with promoter occupancy. In pilot ChIP experiments
333 performed with chromatin prepared from Jurkat cells in absence of any activation, we showed
334 that BCL11B and MTA1 are bound on the *IL2* promoter within a region encompassing the
335 previously described Upstream Site 1 (US1) and on the *Id2* promoter in a newly identified
336 region located just upstream of the transcription start site (TSS) and conserved between the
337 murine and human gene (Fig. 6D and Supplementary Fig. 4) (20, 21). ChIP experiments
338 conducted with Jurkat cells treated with vehicle (DMSO) or with PMA-Ionomycin for 30
339 minutes failed to detect any significant differences in direct BCL11B binding to the *IL2* and
340 *Id2* promoters (Fig. 6E). By contrast, in Jurkat cells activated for 30 minutes to induce the
341 peak of BCL11B Ser2 phosphorylation (Fig. 5A), the *IL2* and *Id2* promoter occupancy by
342 MTA1 was markedly decreased as compared to un-stimulated conditions (Fig. 6F). This
343 effect was not explained by a down-regulation of MTA1 expression since the levels of MTA1
344 RNAs and proteins are even slightly increased by the treatment (Fig. 6C and Supplementary
345 Fig. 3B). Conversely and in perfect agreement with the co-immunoprecipitation experiments,
346 recruitment of the P300 coactivator at the *IL2* and *Id2* promoters is significantly increased
347 after activation of Jurkat cells by PMA-Ionomycin treatment (Fig. 6C-G).

348 Together, these data show that PMA-Ionomycin treatment does not affect direct BCL11B
349 binding to *IL2* and *Id2* promoters but induces its phosphorylation on Ser2, plausibly by PKC,
350 to disrupt interaction with NuRD repressive complexes and to mediate interaction with P300,
351 thereby participating to transcriptional activation.

352

353

354

355 **Activation of primary human CD4⁺ T cells switches BCL11B from a transcriptional**
356 **repressor to a transcriptional activator of *IL2***

357 Since our results have been obtained with the transformed Jurkat CD4⁺ T cell line, we next
358 investigated this BCL11B Ser2 phosphorylation and its resulting transcriptional output during
359 activation of primary human CD4⁺ T cells isolated from peripheral blood mononuclear cells
360 of healthy donors. Purified CD4⁺ T cells were activated with PMA/Ionomycin for 5 hours or
361 with antibodies against CD3 and CD28 for 24 hours to induce TCR stimulation (23). In both
362 conditions, we observed a ca. 2-fold repression of *BCL11B* mRNA level upon TCR activation
363 whereas the levels of BCL11B proteins were roughly identical suggesting some post-
364 translational stabilization mechanisms (Fig. 7A-B). Interestingly, in both activating
365 conditions, a concomitant increase of BCL11B Ser2 phosphorylation and SUMOylation was
366 observed which, consistent with our previous results in Jurkat cells nicely correlated with
367 transcriptional activation of *IL2* (Fig. 7B-C, Supplementary Fig. 3A). The *IL2* induction was
368 particularly efficient (ca. 4000-fold) after physiological stimulation with anti CD3/CD28
369 antibodies. Therefore, this treatment mimicking the canonical activation of T-cells through
370 antigen presenting cells was chosen to perform the ChIP experiments. ChIP analyses of
371 human CD4⁺ T cells after 24h stimulation with anti CD3/CD28 antibodies showed that this
372 activation had no effect on the occupancy and binding of BCL11B on the *IL2* promoter (Fig.
373 7D). However, this treatment also led to a strongly increased recruitment of P300 to this
374 region and a reciprocal reduced occupancy of NuRD repressive complexes as shown by
375 MTA1 (Fig. 7E-F), in close agreement with the huge transcriptional activation of *IL2*
376 measured in the same conditions (Fig. 7C).

377 These results therefore show that upon physiological activation of primary human CD4⁺ T
378 cells, BCL11B through phosphorylation of Serine 2 in its N-terminal repression domain is
379 switched from a transcriptional repressor to an activator of *IL2* expression.

380

381 **DISCUSSION**

382

383 The key findings of this work are that during human CD4⁺ T cell activation, endogenous
384 BCL11B is phosphorylated by PKC on Serine 2 in its conserved N-terminal repression
385 domain and regulates *IL2* gene expression by similarly binding directly its promoter but in
386 association with different transcriptional complexes. Mechanistically, we showed that the N-
387 terminal MSRRKQ motif is necessary and sufficient for interaction with MTA1 or MTA3,
388 two mutually exclusive core components of NuRD complexes and that phosphorylation of
389 Ser2 relieves this interaction. We found that BCL11B is similarly expressed and bound to the
390 *IL2* promoter in resting and in activated human CD4⁺ T cells. In resting cells, BCL11B bound
391 at the *IL2* promoter is unphosphorylated and hence associated with NuRD repressive
392 complexes whereas in activated cells, the BCL11B Ser2 PKC-mediated phosphorylation
393 strongly reduces NuRD binding through inhibition of MTA1 interaction. This loss of NuRD
394 together with the P300 recruitment favored by the concomitant BCL11B SUMOylation
395 participates to *IL2* transcriptional activation.

396 Multiple post-translational modifications (PTMs) of a given protein substrate can occur
397 simultaneously or sequentially and can modulate the function, localization and stability of this
398 protein through cooperative or antagonizing effects on interacting partners. Recently, Bcl11b
399 function as a transcription factor was shown to be finely regulated during TCR activation of
400 resting murine thymocytes by a MAPK-initiated dynamic sequence of PTMs. Indeed,
401 treatment with phorbol ester and calcium ionophore resulted in rapid phosphorylation on 23
402 S/TP sites, deSUMOylation, dephosphorylation, reSUMOylation, ubiquitination and
403 ultimately degradation of Bcl11b (21, 40). Importantly, this complex pathway seems to
404 facilitate derepression of repressed direct target-genes of Bcl11b, as shown for *Id2*, when
405 immature thymocytes need to initiate differentiation programs (21).

406 Here, during activation of purified human CD4⁺ T cells, we describe a different and much
407 simpler PKC-mediated pathway which through phosphorylation of Ser2 in the BCL11B
408 conserved N-terminal repression domain participates to the huge up-regulation of *IL2*, another
409 BCL11B direct target gene. Notably, this is the first description at the endogenous level of a
410 PTM targeting this MSRRKQ motif shared by several distinct nuclear proteins. Such a PKC-
411 mediated phosphorylation has been previously suggested for the Sall1 transcription factor but
412 only by *in vitro* studies including transient transfection and generation of point mutants (26).
413 Thanks to a newly obtained BCL11B Ser2 phospho-specific antibody, we demonstrated that
414 endogenous BCL11B proteins were phosphorylated during activation of CD4⁺ T cells.
415 Noteworthy, in CD4⁺ T lymphocytes, this BCL11B N-terminal domain is essential for the
416 transcriptional repression of HIV-1 LTR sequences which thus affects both HIV-1 replication
417 and virus production (41). In addition, this N-terminal domain (AA 1-20) is lost in the
418 HELIOS-BCL11B fusion protein generated by a reciprocal t(2;14)(q34; q36) translocation in
419 an adult T-cell leukemia (42).

420

421 The phosphorylation of Bcl11b Ser2 has not been detected during differentiation of murine
422 thymocytes (21). Of course, the cell populations analyzed in this study and in our work are
423 different: resting murine thymocytes, 90% being DP cells versus purified human CD4⁺ T
424 cells. In addition, this N-terminal region was not present in the coverage map of Bcl11b PTMs
425 identified by tandem mass spectrometry (21, 40). In fact, the use of trypsin digests which cut
426 after Arginine and Lysine residues is predicted to generate in that case a very short and hardly
427 detectable MSR peptide.

428 The Ser2 phosphorylation peak in Jurkat cells is concomitant with the SUMOylation peak
429 (Fig. 5A). In addition, a specific PKC inhibitor has no effect on the SUMOylation of BCL11B
430 (Fig. 5B). By contrast, the multiple phosphorylation events induced by the MAPK pathway in

431 murine thymocytes favor the interaction of Bcl11b with the deSUMOylase SENP1 (21).
432 Another major difference is the lack of ubiquitination of human BCL11B after prolonged
433 PMA/Ionomycin treatment of Jurkat cells. In fact, the slight decrease of proteins levels
434 observed after 2 hours of activation seems to mainly rely on BCL11B transcriptional
435 repression rather than on protein degradation (Fig. 5D).

436 These different MAPK- or PKC-mediated pathways however both orchestrate the
437 transcriptional activity of BCL11B to allow derepression of direct target genes, albeit through
438 strikingly different mechanisms. Indeed, through quantitative ChIP experiments in Jurkat cells
439 activated for 30 min with PMA/Ionomycin or in purified normal human CD4⁺ T cells treated
440 for 24 hours with anti CD3/CD28, we observed similar binding of BCL11B to the *IL2*
441 promoter as compared to basal conditions. However, in these activating conditions, which
442 result in BCL11B Ser2 phosphorylation, the levels of MTA1 are severely reduced at the *IL2*
443 promoter whereas P300 levels reciprocally increase. These observations nicely correlate with
444 the results of our Co-IP experiments and the induction of *IL2* expression. By contrast, in
445 developing murine thymocytes, Bcl11b and MTA1 remained associated at the *Id2* promoter
446 both in basal conditions and activating conditions, as shown by ChIP experiments and
447 identification of Bcl11b partners by mass spectrometry analyses (21). However, as stated by
448 these authors, the possibility that MTA1 and/or other NuRD component proteins became post-
449 translationally modified as a consequence of this treatment has not been investigated in detail.

450 This is an important issue since the C-terminal end of MTA proteins involved in the
451 interaction with MSRRKQ-proteins is subject to extensive post-translational modifications.
452 Notably, the methylation-demethylation of MTA1 Lysine 532 regulates its cyclical- and
453 signaling- dependent association with NuRD corepressor or NuRF co-activator complexes,
454 respectively (43). The transcriptional co-factor FOG-1 (Friend of GATA) also interacts with
455 NuRD through a N-terminal MSRRKQ motif and this interaction plays a key role for lineage

456 commitment during erythropoiesis and megakaryopoiesis (34, 35, 44, 45). Strikingly, ChIP
457 experiments revealed that NuRD components are present at both repressed and active GATA-
458 1/FOG-1 target genes (45). As a whole, these results suggest two possible mechanisms for
459 interaction of MTA1 with different transcription factors depending on the cellular context: (i)
460 binding of MTA1 to the target genes both in active or repressive conditions but with PTMs
461 fine-tuning its interaction with repressive or activating complexes as reported for GATA-
462 1/FOG-1 or (ii) presence only in repressive conditions and loss of interaction in activating
463 conditions due to specific PTMs in short MTA1-interacting motifs, as shown here for PKC-
464 mediated phosphorylation of BCL11B in CD4⁺ T cells. Interestingly, the interaction of the
465 two BTB/POZ transcriptional repressors HIC1 and BCL6 with MTA1 and MTA3,
466 respectively, are inhibited by acetylation of a lysine residue in different conserved peptidic
467 interaction motifs (46, 47). The BCL6-MTA3 interaction is crucial for normal B cell
468 differentiation and a Knock-in model mimicking constitutive acetylation of BCL6 in mice
469 (K³⁸⁷KYK³⁹⁰ to QQYQ) clearly demonstrated that this motif is involved in the commitment of
470 active B cells toward the Germinal Center (GC) phenotype (47, 48). In diffuse B-cell
471 lymphomas (DLBCL) with *BCL6* translocations, the perturbation of this BCL6-MTA3
472 interaction contributes to a blockade of leukemic cells at an immature progenitor stage (49).
473 PTMs (specially phosphorylation) are predominantly found in intrinsically disordered proteins
474 (IDPs) predicted to be entirely disordered as well as in particular regions of proteins referred
475 to as intrinsically disordered regions (IDRs) which in contrast to structured globular domains
476 are predicted to be entirely disordered (50). Using two bioinformatics prediction programs,
477 PONDR (Predictor Of Naturally Disordered Regions) and ELM (Eukaryotic Linear Motif),
478 BCL11B appears as an highly disordered protein with the notable exception of the 6 C₂H₂
479 Zinc Finger domains. The 2-8 AA region including the MSRRKQ motif is totally disordered.
480 Here, we demonstrated that this short motif is necessary and sufficient to mediate binding to

481 the three members of MTA co-repressors family. This enables BCL11B and more generally
482 MSRRKQ-containing proteins to interact with the complete range of NuRD complexes and
483 highlights its flexibility to participate to various differentiation programs involved in the
484 development of the immune and nervous (CNS) systems and to regulate tissue-specific gene
485 expression in many distinct cellular types including T and B cells, ameloblasts or
486 keratinocytes (16).

487 Although our studies have been focused on BCL11B, it is tempting to speculate that similar
488 PTMs could be identified in other MSRRKQ-containing nuclear proteins. Indeed, the
489 developmental regulator SALL1 is certainly regulated by PKC-phosphorylation on Serine 2,
490 as suggested by *in vitro* studies (26). For FOG-1, the role of Ser2 has been investigated only
491 through Alanine scanning experiments which demonstrated that this S2A mutation did not
492 affect the repression potential of a FOG1 1-12 Gal4 chimera (34). However, these *in vitro*
493 studies or *in vivo* Knock-in models in mice and the crystal structure of RbAp48 (another
494 NuRD component) bound to the 15 N-terminal amino-acids of FOG-1 have provided
495 compelling evidences for the key roles played by Arg3, Arg4 and Lys5 in the conserved
496 MSRRKQ motif (34, 35, 44, 45, 51). Dynamic methylation of Lysine and Arginine residues
497 in non-histone proteins have emerged as important PTMs influencing numerous cellular
498 functions involved in normal development or tumorigenesis (52, 53). Therefore, it might be
499 worthwhile to conduct M/S analyses of MSRRKQ-containing proteins with other proteolytic
500 cleavages (e.g. chymotrypsin) to allow visualization of this N-terminal peptide in different
501 cellular contexts.

502 In conclusion, we have identified a novel mechanism for how the essential regulator of T cell
503 development BCL11B is regulated by PKC-mediated phosphorylation of Ser2 in its conserved
504 N-terminal repression domain during activation of CD4⁺ T cells. In future studies, it would be
505 interesting to explore if this switch between transcriptional repression and activation by

506 phosphorylation or other PTMs (methylation) in their MSRRKQ motifs could be generalized
507 to BCL11A or FOG-1, two important regulators of differentiation programs during normal
508 hematopoiesis.

509

510 **ACKNOWLEDGMENTS**

511 This work was supported by the CNRS, the “Ligue Nationale contre le Cancer”, Comité du
512 Pas de Calais and Santelys. Marion Dubuissez is supported by a predoctoral fellowship from
513 the University of Lille. We thank Dr Capucine Van Rechem for critical reading of the
514 manuscript.

515

516

REFERENCES

- 517 [1] **Avram D, Fields A, Pretty On Top K, Nevriy DJ, Ishmael JE, Leid M.** 2000.
518 Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional
519 repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
520 (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* 275:10315-10322.
- 521 [2] **Avram D, Fields A, Senawong T, Topark-Ngarm A, M. Leid M.** 2002. COUP-TF
522 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1
523 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem J* 368:555-563.
- 524 [3] **Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T,**
525 **Mishima Y, Niwa O, Kominami R.** 2003. Homozygous deletions and point mutations
526 of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem*
527 *Biophys Res Commun* 301:598-603.
- 528 [4] **Avram D, Califano D.** 2014. The Multifaceted Roles of Bcl11b in Thymic and Peripheral
529 T Cells: Impact on Immune Diseases. *J Immunol* 193:2059-2065.

- 530 [5] **Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J,**
531 **Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S, Kominami R.** 2003. Bcl11b is
532 required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol*
533 4:533-539.
- 534 [6] **Albu DI, Feng D, Bhattacharya D, Jenkins NA, Copeland NG, Liu P, Avram D.** 2007.
535 BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *J*
536 *Exp Med* 204:3003-3015.
- 537 [7] **Li L, Leid M, Rothenberg EV.** 2010. An early T cell lineage commitment checkpoint
538 dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* 329:89-93.
- 539 [8] **Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee SC, Lu D, Campos L, Goulding D, Ng**
540 **BL, Dougan G, Huntly B, Gottgens B, Jenkins NA, Copeland NG, Colucci F, and**
541 **P. Liu P.** 2010. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b
542 deletion. *Science* 329: 85-9.
- 543 [9] **Kastner P, Chan S, Vogel WK, Zhang LJ, Topark-Ngarm A, Golonzhka O, Jost B,**
544 **Le Gras S, Gross MK, Leid M.** 2010. Bcl11b represses a mature T-cell gene
545 expression program in immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Eur J Immunol* 40:2143-
546 54.
- 547 [10] **Gutierrez A, Kentsis A, Sanda T, Holmfeldt L, Chen SC, Zhang J, Protopopov A,**
548 **Chin L, Dahlberg SE, Neuberg DS, Silverman LB, Winter SS, Hunger SP, Sallan**
549 **SE, Zha S, Alt FW, Downing JR, Mullighan CG, Look AT.** 2011. The BCL11B
550 tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute
551 lymphoblastic leukemia. *Blood* 118:4169-73.
- 552 [11] **Kominami R.** 2012. Role of the transcription factor Bcl11b in development and
553 lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88:72-87.
- 554 [12] **Di Santo JP.** 2010. Immunology. A guardian of T cell fate. *Science* 329 44-5.

- 555 [13] **Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T, Jenkins NA,**
556 **Copeland NG.** 2003. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat*
557 *Immunol* 4:525-32.
- 558 [14] **Sankaran VG, Xu J, Ragoczy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, Fujiwara Y,**
559 **Ito M, Groudine M, Bender MA, Tucker PW, Orkin SH.** 2009. Developmental and
560 species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 460:1093-1097.
- 561 [15] **Bauer DE, Kamran SC, Orkin SH.** 2012. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for
562 new therapies for the beta-globin disorders. *Blood* 120:2945-2953.
- 563 [16] **Le Douce V, Cherrier T, Riclet R, Rohr O, Schwartz C.** 2014. The many lives of
564 CTIP2: from AIDS to cancer and cardiac hypertrophy. *J Cell Physiol* 229:533-537.
- 565 [17] **Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, Aunis D,**
566 **Rohr O.** 2007. Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-
567 1 transcriptional silencing. *Embo J* 26:412-423.
- 568 [18] **Cismasiu VB, Adamo K, Gecewicz J, Duque J, Lin Q, Avram D.** 2005. BCL11B
569 functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted
570 promoter. *Oncogene* 24:6753-6764.
- 571 [19] **Cismasiu VB, Duque J, Paskaleva E, Califano D, Ghanta S, Young HA, Avram D.**
572 2009. BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF-kappaB activation through up-
573 regulation of Cot kinase gene expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 417:457-466.
- 574 [20] **Cismasiu VB, Ghanta S, Duque J, Albu DI, Chen HM, Kasturi R, Avram D.** 2006.
575 BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes.
576 *Blood* 108:2695-2702.
- 577 [21] **Zhang LJ, Vogel WK, Liu X, Topark-Ngarm A, Arbogast BL, Maier CS, Filtz TM,**
578 **Leid M.** 2012. Coordinated regulation of transcription factor Bcl11b activity in

579 thymocytes by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and protein
580 sumoylation. *J Biol Chem* 287:26971-26988.

581 [22] **Filtz TM, Vogel WK, Leid M.** 2014. Regulation of transcription factor activity by
582 interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci* 35:76-85.

583 [23] **Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, Vorng H, Morales O, Fan Y, Delhem N, Ple C,**
584 **Tonnel AB, Wallaert B, Tsicopoulos A.** 2011. CCL18 differentiates dendritic cells in
585 tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood* 118:3549-
586 3558.

587 [24] **Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, Dequiedt F, Goumon Y,**
588 **J.C. Paillart JC, Mericskay M, Parlakian A, Bausero P, Abbas W, Herbein G,**
589 **Kurdistani SK, Grana X, Van Driessche B, Schwartz C, Candolfi E, Benecke AG,**
590 **Van Lint C, Rohr O.** 2013. CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad*
591 *Sci U S A* 110:12655-12660.

592 [25] **Lauberth SM, Rauchman M.** 2006. A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits
593 the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem*
594 281:23922-23931.

595 [26] **Lauberth SM, Bilyeu AC, Firulli BA, Kroll KL, Rauchman M.** 2007. A
596 phosphomimetic mutation in the Sall1 repression motif disrupts recruitment of the
597 nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of Gbx2. *J Biol Chem*
598 282:34858-34868.

599 [27] **Chen L, Meng Q, Jing X, Xu P, Luo D.** 2011. A role for protein kinase C in the
600 regulation of membrane fluidity and Ca(2)(+) flux at the endoplasmic reticulum and
601 plasma membranes of HEK293 and Jurkat cells. *Cell Signal* 23:497-505.

602 [28] **Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, Leprince D.**
603 2012. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2

604 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like
605 (hPCL) proteins. *J Biol Chem* 287:10509-10524.

606 [29] **Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C, Leprince D.** 2013.
607 DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by
608 SUMOylation to regulate DNA repair. *J Biol Chem* 288:10254-10264.

609 [30] **Dege C, Hagman J.** 2014. Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and
610 T-lymphocyte development and function. *Immunol Rev* 261:126-140.

611 [31] **Manavathi B, Singh K, Kumar R.** 2007. MTA family of coregulators in nuclear
612 receptor biology and pathology. *Nucl Recept Signal* 5:e010.

613 [32] **Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price**
614 **HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, SiebertR, Tucker PW,**
615 **Dyer MJ.** 2001. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid
616 malignancies. *Blood* 98:3413-3420.

617 [33] **Durum SK.** 2003 Bcl11: sibling rivalry in lymphoid development. *Nat Immunol* 4:512-
618 514.

619 [34] **Lin AC, Roche AE, Wilk J, Svensson EC.** 2004. The N termini of Friend of GATA
620 (FOG) proteins define a novel transcriptional repression motif and a superfamily of
621 transcriptional repressors. *J Biol Chem* 279:55017-55023.

622 [35] **Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C, Blobel GA.**
623 2005. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression
624 by GATA-1. *Embo J* 24:2367-2378.

625 [36] **Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C,**
626 **Dejean A, Leprince D.** 2007. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch
627 through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1
628 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27:2661-2675.

- 629 [37] **Kennelly PJ, Krebs EG.** 1991. Consensus sequences as substrate specificity
630 determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266:15555-
631 15558.
- 632 [38] **Kong KF, Altman A.** 2013. In and out of the bull's eye: protein kinase Cs in the
633 immunological synapse. *Trends Immunol* 34:234-242.
- 634 [39] **Namkung Y, Sibley DR.** 2004. Protein kinase C mediates phosphorylation,
635 desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279:49533-
636 49541.
- 637 [40] **Vogel WK, Gafken PR, Leid M, Filtz TM.** 2014. Kinetic analysis of BCL11B multisite
638 phosphorylation-dephosphorylation and coupled sumoylation in primary thymocytes by
639 multiple reaction monitoring mass spectroscopy. *J Proteome Res* 13:5860-5868.
- 640 [41] **Cismasiu VB, Paskaleva E, Suman Daya S, Canki M, Duus K, Avram D.** 2008.
641 BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T
642 lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* 380:173-181.
- 643 [42] **Fujimoto R, Ozawa T, Itoyama T, Sadamori N, Kurosawa N, Isobe M.** 2012.
644 HELIOS-BCL11B fusion gene involvement in a t(2;14)(q34;q32) in an adult T-cell
645 leukemia patient. *Cancer Genet* 205:356-364.
- 646 [43] **Nair SS, Li DQ, Kumar R.** 2013. A core chromatin remodeling factor instructs global
647 chromatin signaling through multivalent reading of nucleosome codes. *Mol Cell*
648 49:704-718.
- 649 [44] **Gao Z, Huang Z, Olivey HE, Gurbuxani S, Crispino JD, Svensson EC.** 2010. FOG-
650 1-mediated recruitment of NuRD is required for cell lineage re-enforcement during
651 haematopoiesis. *Embo J* 29 457-68.

- 652 [45] **Miccio A, Wang Y, Hong W, Gregory GD, Wang H, Yu X, Choi JK, Shelat S, Tong**
653 **W, Ponz M, Blobel GA.** 2010. NuRD mediates activating and repressive functions of
654 GATA-1 and FOG-1 during blood development. *Embo J* 29:442-456.
- 655 [46] **Van Rechem C, Boulay G, Pinte S, Stankovic-Valentin N, Guerardel C, Leprince D.**
656 2010. Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an
657 acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol Cell Biol*
658 30:4045-4059.
- 659 [47] **Fujita N, Jaye DL, Geigerman C, Akyildiz A, Mooney MR, Boss JM, Wade PA.**
660 2004. MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte
661 differentiation. *Cell* 119:75-86.
- 662 [48] **Huang C, Gonzalez DG, Cote CM, Jiang Y, Hatzi K, Teater M, Dai K, Hla T,**
663 **Haberman AM, Melnick A.** 2014. The BCL6 RD2 domain governs commitment of
664 activated B cells to form germinal centers. *Cell Rep* 8 1497-1508.
- 665 [49] **Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, Juszczynski P, Lev P, Ranuncolo SM, Yin Y,**
666 **Klein U, Cattoretti G, Dalla Favera R, Shipp MA, Melnick A.** 2007. BCL6 programs
667 lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical
668 mechanisms. *Blood* 110:2067-2074.
- 669 [50] **Wright PE, Dyson HJ.** 2014. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and
670 regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:18-29.
- 671 [51] **Lejon S, Thong SY, Murthy A, AlQarni S, Murzina NV, Blobel GA, Laue ED,**
672 **Mackay JP.** 2011. Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the
673 crystal structure of an RbAp48.FOG-1 complex. *J Biol Chem* 286:1196-1203.
- 674 [52] **Hamamoto R, Saloura V, Nakamura Y.** 2015. Critical roles of non-histone protein
675 lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 15:110-124.

676 [53] **Wei H, Mundade R, Lange KC, Lu T.** 2014. Protein arginine methylation of non-
677 histone proteins and its role in diseases. *Cell Cycle* 13:32-41.

678 [54] **Yoon SJ, Lee MJ, Shin DC, Kim JS, Chwae YJ, Kwon MH, Kim K, Park S.** 2011.
679 Activation of mitogen activated protein kinase-Erk kinase (MEK) increases T cell
680 immunoglobulin mucin domain-3 (TIM-3) transcription in human T lymphocytes and a
681 human mast cell line. *Mol Immunol* 48:1778-83.

682

683 **TABLES**

684 Two Tables listing the various oligonucleotides used in the RT-qPCR and ChIP-qPCR
685 experiments can be found as Supplemental Information on line.

686

687 **FIGURE LEGENDS**

688

689 **Figure 1. *BCL11A and BCL11B interacts with MTA1 and MTA3.*** (A) MTA1 interacts with
690 BCL11B. HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated plasmids and the
691 empty pcDNA3-FLAG vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH
692 buffer, incubated with anti-FLAG antibodies (Top panels, **IP FLAG**, lanes 1 to 4) and
693 immunoblotted with goat polyclonal antibodies against MTA1 to detect co-
694 immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-FLAG antibodies to verify
695 the presence of BCL11B proteins. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE
696 and immunoblotted with the indicated antibodies (Lower panels, **INPUT**). (*) corresponds to
697 the endogenous MTA1 proteins visualized as a doublet. The arrowhead indicates potentially
698 SUMOylated MTA1 proteins. Note that FLAG-BCL11B efficiently co-immunoprecipitate
699 endogenous MTA1 (lane 3) (B) BCL11B interacts with MTA3. A similar experiment was
700 conducted in HEK293T cells with BCL11B and MTA3 expression vectors. (C) Co-

701 immunoprecipitation of endogenous nuclear BCL11B proteins by MTA1 in MOLT4 cells.
702 (D) Co-immunoprecipitation of endogenous nuclear BCL11B proteins by MTA3 in MOLT4
703 cells. (E) Co-immunoprecipitation of endogenous nuclear BCL11A proteins by MTA1 in
704 MOLT4 cells. (F) Co-immunoprecipitation of endogenous nuclear BCL11A proteins by
705 MTA3 in MOLT4 cells.

706

707 **Figure 2.** *The conserved N-terminal motif of BCL11B interacts with MTA1 and MTA3 and is*
708 *an autonomous transcriptional repression domain negatively regulated by phosphorylation of*
709 *Serine 2. (A) Schematic representation of the various BCL11B N-terminal fragments cloned*
710 *in frame with the Gal4 binding domain, a Nuclear localization signal (NLS) and an epitope*
711 *tag (HA) in the Gal4-NLS-HA eukaryotic. (B) Phosphorylation of BCL11B Serine 2 prevents*
712 *interaction with MTA1. HEK293T were transfected for 48h with the indicated expression*
713 *vectors. Then, whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-MTA1*
714 *antibodies (Top panels, **IP MTA1**) and the immunoprecipitated material was immunoblotted*
715 *with the indicated antibodies. The membrane was then re-probed with anti-MTA1 antibodies*
716 *to verify the presence of MTA1 proteins. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-*
717 *PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Lower panels, **INPUT**). (C) The*
718 *BCL11B-MTA3 interaction is also negatively regulated by phosphorylation of BCL11B*
719 *Serine 2. A similar experiment was performed in HEK293T with FLAG-MTA3 plasmid and*
720 *the BCL11B-Gal4 chimeras. (D) The conserved BCL11B N-terminal domain represses*
721 *transcription. The transcriptional activity of BCL11B-Gal4 constructs was tested by transient*
722 *luciferase reporter assays. HEK293T cells were transfected in triplicate with the luciferase*
723 *reporter plasmid pGL3-5xGal4 RE-tk luc (luciferase expression under the control of Gal4*
724 *responsive elements) or the pGL3-empty vector in combination with various BCL11B-Gal4*
725 *constructs. After normalization to the β -galactosidase activity, the data were expressed as the*

726 Luc activity relative to the activity of pG3-Luc with pSG5-Gal4-NLS-HA used a negative
727 control vector which was given an arbitrary value of 1. The results represent the mean values
728 from three independent transfections in triplicate. (E) Phosphorylation of BCL11B Serine 2 in
729 the BCL11B N-terminal domain partially inhibits its transcriptional repression potential. A
730 similar luciferase reporter assay was conducted in HEK293T with the 1-20 BCL11B wild-
731 type (WT) and the S2D point mutant.

732

733 **Figure 3.** *Phosphorylation of Serine 2 in the BCL11B conserved N-terminal motif inhibits*
734 *NuRD recruitment by disrupting the interaction with MTA1 and MTA3.* (A) schematic
735 drawing of full-length BCL11B proteins as well as the phosphodeficient (S2A) and
736 phosphomimetic (S2D) point or deletion (Δ MSRRKQ) mutants thereof. (B) The interaction
737 with MTA1 is prevented by the S2D phosphomimetic mutation of BCL11B. HEK293T were
738 transiently transfected for 48h with the indicated plasmids and the empty pcDNA3-FLAG
739 vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with
740 anti-c-myc antibodies (Top panel, **IP c-myc**, lanes 1 to 4) and immunoblotted with anti-FLAG
741 antibodies to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with goat
742 polyclonal antibodies against MTA1. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE
743 and immunoblotted with the indicated antibodies (**INPUT**). (C) The interaction with MTA3 is
744 also prevented by the S2D phosphomimetic mutation of BCL11B. A similar experiment was
745 realized in HEK293T but with the FLAG-MTA3 expression vector. Relevant pieces of the
746 membranes were cut (around the 80KDa marker to separate the MTA3 and BCL11B proteins)
747 and probed with anti-FLAG antibodies. (D) The MSRRKQ motif is necessary for the
748 interaction with MTA3. A similar experiment was realized in HEK293T with the FLAG-
749 Δ MSRRKQ BCL11B and FLAG-MTA3 expression vectors. (E) The N-terminal MSRRKQ
750 motif is necessary to interact with endogenous MTA1 proteins. HEK293T cells were

751 transfected with the mentioned vectors including MTA1 alone as control, the two BCL11B
752 point mutants, the Δ MSRRKQ deletion mutant as well as WT BCL11B and were submitted to
753 co-immunoprecipitation with the anti-FLAG antibody (Two top panels, **IP FLAG**). The
754 immunoprecipitates as well as 1% of the whole cell lysates (Two lower panels, **INPUT**) were
755 then analyzed by Western blotting as described above. (F) The phosphomimetic mutation S2D
756 severely impaired interaction of full-size BCL11B with endogenous components of NuRD
757 complexes. HEK293T cells transfected with the indicated expression vectors were submitted
758 to co-immunoprecipitation with the anti-FLAG antibody (Right panels, **IP FLAG**). The co-
759 immunoprecipitated endogenous proteins as well as 1% of the whole cell lysate (**INPUT**)
760 were then analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

761

762 **Figure 4.** *In vivo phosphorylation of BCL11B Serine 2 upon PKC activation.* (A) PMA
763 induced *in vivo* phosphorylation of BCL11B Ser2. HEK293T cells were transfected for 48h
764 with FLAG-BCL11B WT expression vector and mock-treated (-), incubated with vehicle
765 (DMSO) or treated with PMA (1 μ M in DMSO for 20 minutes). Then, whole cells extracts
766 were prepared in RIPA buffer, immunoprecipitated with anti-FLAG antibody (Top panels, **IP**
767 **FLAG**) and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies specific for phosphorylated
768 Ser2 (Phospho-Ser2 BCL11B) and with FLAG antibodies as control for BCL11B expression.
769 1% of the whole cell lysates (**INPUT**) were also analyzed by Western blotting with FLAG
770 antibodies and with Phospho-Erk 1/2 as a control of BCL11B expression and PMA treatment,
771 respectively (21, 54). (B) A similar experiment was performed to compare the
772 phosphodeficient BCL11B S2A mutant (left panel) which is not detected by the anti Phospho-
773 Ser2 antibodies in activated conditions (lane 3) with WT BCL11B (right panel) which is
774 detected by the phosphospecific antibodies (lane 6). * refers to a non-specific band. (C) PKC
775 is implicated in BCL11B Ser2 phosphorylation. HEK 293T cells were transfected with

776 BCL11B and activated exactly as in panel A. One plate was pre-incubated with the universal
777 inhibitor of PKC isoforms BIMII (10 μ M for 30 minutes) before PMA activation. (D) Time
778 course of BCL11B Serine 2 phosphorylation and SUMOylation. 48h after transfection,
779 HEK293T cells were treated with DMSO (vehicle) or PMA (1 μ M in DMSO) as indicated
780 before being harvested and analysed by Western blotting with anti Phospho-Ser2 BCL11B,
781 with anti BCL11B antibodies which detect SUMOylated forms of BCL11B (indicated by an
782 arrowhead) and with the FLAG antibodies (which for unknown reasons do not detect
783 SUMOylation of BCL11B). The SUMOylation site is perfectly conserved between the murine
784 and human BCL11B proteins (21). Phospho-erk1/2 and actin were used as controls for PKC
785 activation and for equal loading respectively. Then, quantification of phosphorylated and
786 SUMOylated BCL11B were performed with the Fujifilm MultiGauge software. (E) The PKC
787 pathway has no effect on BCL11B SUMOylation in striking contrast with the ERK pathway.
788 HEK 293T cells were transfected with BCL11B and activated exactly as described above.
789 One plate was pre-incubated with the PKC inhibitor BIMII (10 μ M for 30 minutes) (lane 3) or
790 with the Erk inhibitor, U0126 (10 μ M for 30 minutes) (lane 2) before PMA activation. To
791 detect SUMOylated forms of BCL11B (indicated by an arrowhead), transfected cells were
792 directly lysed in Laemmli buffer, boiled and analysed by Western blotting with the indicated
793 antibodies. Phospho-erk1/2 and actin were used as controls for inhibitor treatments and for
794 equal loading respectively.

795

796 **Figure 5.** *Endogenous BCL11B proteins are phosphorylated on Serine 2 and SUMOylated in*
797 *activated Jurkat cells.* (A) Activation of Jurkat cells with PMA/Ionomycin induces Serine 2
798 Phosphorylation of endogenous BCL11B proteins. Jurkat cells were treated with vehicle
799 (DMSO) or with PMA/Ionomycin (to mimic a complete activation of lymphoid cells) for the
800 indicated time before being harvested and analysed by Western blotting with the indicated

801 antibodies. Phospho-erk1/2 and actin were used as controls for inhibitor treatments and for
802 equal loading respectively. Then, quantification of total pSer/Thr BCL11B phosphorylation as
803 well as Ser2-phosphorylated and SUMOylated BCL11B were performed with the Fujifilm
804 MultiGauge software. In Jurkat cells, two slowly migrating BCL11B-SUMOylated species
805 (arrowheads) are detected as previously shown in activated murine thymocytes (21). (B)
806 BCL11B is phosphorylated by PKC on Serine 2 during PMA/Ionomycin activation of Jurkat
807 cells. Jurkat cells were treated with DMSO (lane 1) or with PMA/Ionomycin for 30 minutes
808 (lanes 2 to 4) without (lane 2) or with pre-incubation with the PKC inhibitor Gö6983 (1 μ M
809 for 15 minutes) (lane 3) or with the Erk inhibitor, U0126 (10 μ g/ml for 15 minutes) (lane 4).
810 Total cell lysates were analysed by Western blotting as described above. (C) Detection of
811 endogenous BCL11B SUMOylation in Jurkat cells. Jurkat cells were treated with DMSO or
812 PMA/Ionomycin for 1 hour to induce SUMOylation (see panel A). To detect SUMOylated
813 proteins, the cells were lysed in 1 volume 1% SDS and immediately boiled for 10 minutes.
814 Then, the lysates were diluted with 9 volumes of RIPA buffer without SDS and
815 immunoprecipitated with anti-BCL11B antibodies. The immunoprecipitates were then
816 analysed by Western blotting with anti SUMO2 (upper panel). The SUMOylated BCL11B
817 proteins are indicated by an arrowhead. The membranes were striped and reprobred with anti-
818 BCL11B antibodies. (D) Activation of Jurkat cells by PMA/Ionomycin induced down-
819 regulation of BCL11B expression. Jurkat cells were treated with DMSO (vehicle, black
820 columns) or activated with PMA/Ionomycin (white columns) for the indicated times. Total
821 RNAs were extracted and BCL11B expression levels were determined by qRT-PCR analyses.

822

823 **Figure 6.** *BCL11B-mediated repression of IL2 expression through MTA1 recruitment in un-*
824 *stimulated cells is lost during Jurkat cells activation by PMA/Ionomycin treatment. (A, B)*

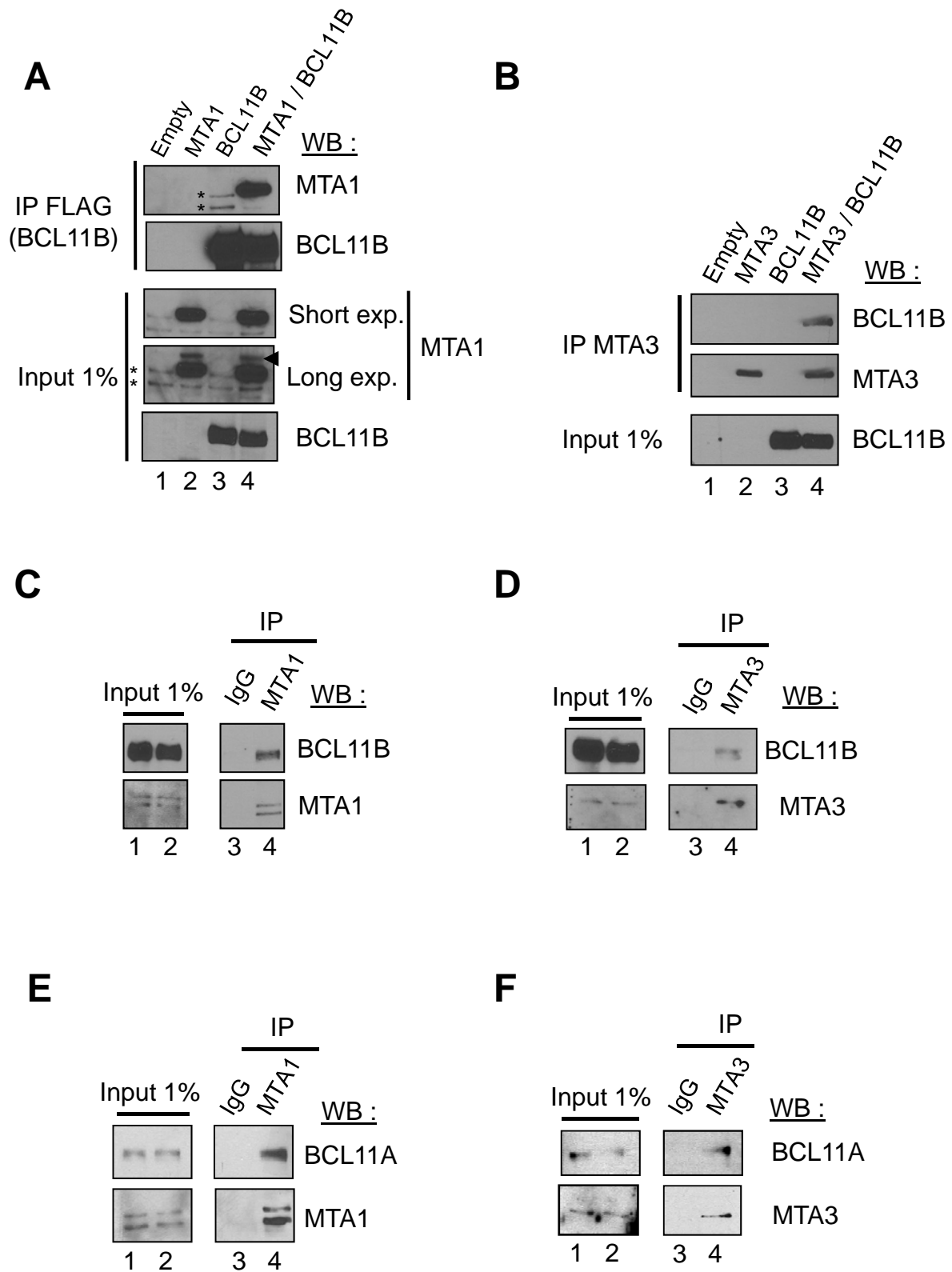
825 Activation of human Jurkat CD4⁺ T cells by PMA/Ionomycin induced an increase of *IL2* and

826 *Id2* expression. Jurkat cells were treated with DMSO or activated with PMA/Ionomycin for
827 the indicated times. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to
828 analyse the increase of *IL2* (A) and *Id2* (B) expression levels after activation of Jurkat cells.
829 Due to the huge induction of *IL2* expression after prolonged stimulation, the *IL2* expression
830 levels measured after 2 and 5 hours of treatment are shown with a different scale as
831 Supplementary Figure 3A (C) *In vivo* endogenous P300 preferentially interacts with BCL11B
832 after PMA/Ionomycin activation of Jurkat T cells. Jurkat T cells were activated for 30 minutes
833 with PMA/Ionomycin to induce BCL11B Ser2 phosphorylation or treated with DMSO as
834 control. After 30 minutes, cells were lysed in IPH buffer and 2% were kept as input (bottom
835 panels). Equal amounts of DMSO- or PMA/Ionomycin-treated cells were immunoprecipitated
836 with anti BCL11B. As control, PMA/Ionomycin-treated cells were immunoprecipitated with
837 total rabbit IgG. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blot with the
838 indicated antibodies. (D) Schematic drawing of the human *Id2* proximal promoter region. The
839 Transcription Start Site (TSS) is derived from the BCL11B locus found in the NCBI
840 Nucleotide database as NC_000002 (Homo sapiens chromosome 2, GRCh38 Primary
841 assembly Region: 8680983.....86684453; Gi: 568815596). We focused on the region just
842 upstream of the TSS since this region is predicted to contain several BCL11B binding sites as
843 shown by ChIP-Seq analyses of BCL11B binding in double positive human thymocytes (9).
844 Clustal alignments of the corresponding human and murine regions highlighted a conserved
845 potential BCL11B direct binding site, TGGGC, which has been analyzed in ChIP-qPCR
846 experiments in Jurkat cells using relevant oligonucleotides (shown as arrowheads). (E, F and
847 G) ChIP experiments were performed on Jurkat cells chromatin with antibody against
848 BCL11B, against MTA1 or against P300, on chromatin prepared as previously described (28).
849 The bound material was eluted and analysed by quantitative PCR using primers flanking the
850 US1 BCL11B binding site previously identified in the human *IL2* promoter and the newly

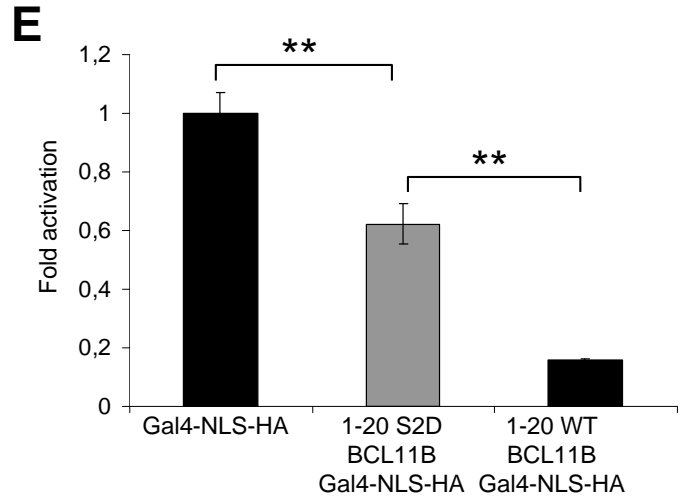
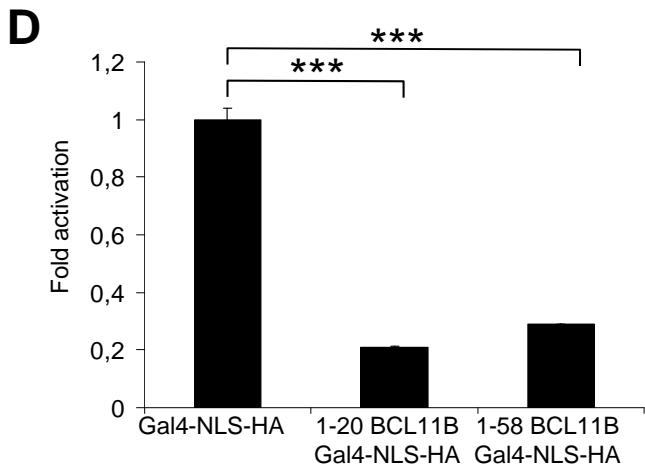
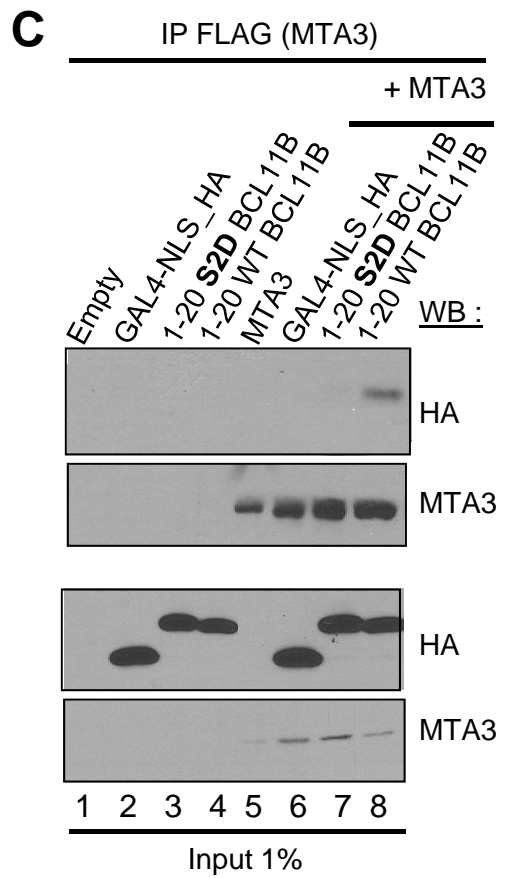
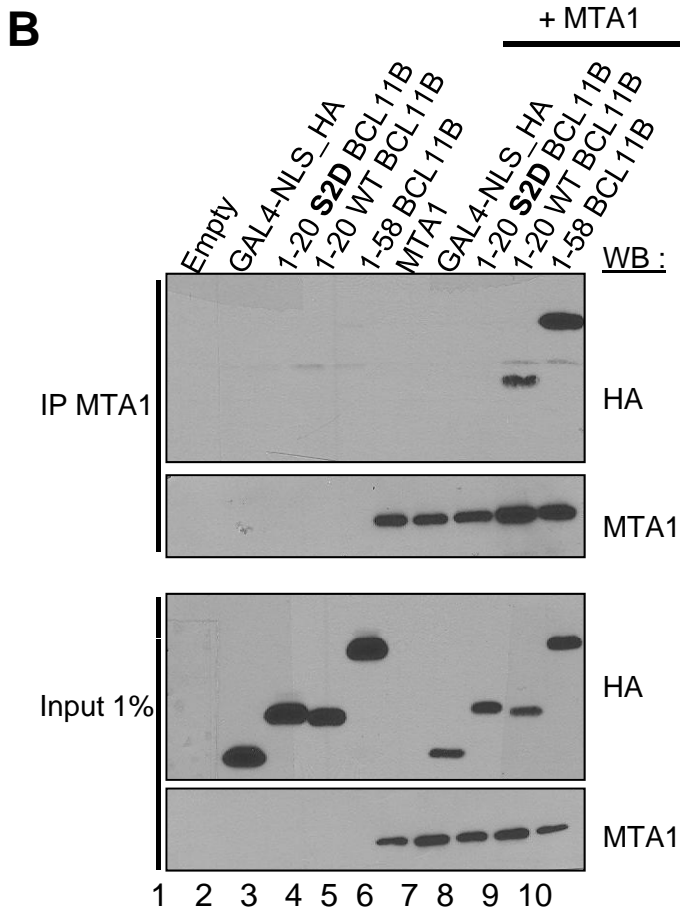
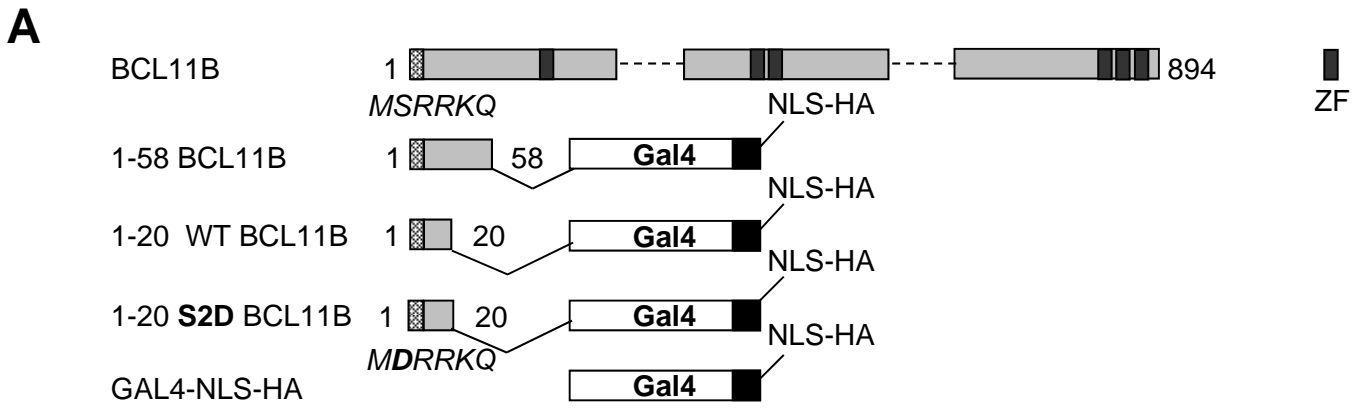
851 identified core TGGGC BCL11B binding site located just upstream of the transcription start
852 site (TSS) in the human *Id2* gene (20). *GAPDH* was used as an internal nonbinding control.

853 **Figure 7.** *Activation of human CD4⁺ T cells induces phosphorylation of BCL11B Serine 2 in*
854 *vivo* (A) Activation of primary human CD4⁺ T cells by PMA/Ionomycin or by anti
855 CD3/CD28 antibodies induced down-regulation of *BCL11B* expression as measured by RT-
856 qPCR analyses. RT-qPCR experiments were performed to analyse *BCL11B* expression. (B) *In*
857 *vivo* analyses of endogenous BCL11B phosphorylation on Serine 2 and SUMOylation in
858 activated human CD4⁺ T cells. To favour detection of endogenous SUMOylation, CD4⁺ T
859 cells were directly lysed in Laemmli buffer, boiled and analysed by Western blotting with the
860 indicated antibodies, 5h or 24h after PMA/Ionomycin- or anti-CD3/CD28-treatment
861 respectively. The arrowhead corresponds to SUMOylated BCL11B proteins. RT-qPCR
862 experiments were performed to analyse *BCL11B* expression. (C) Increase of *IL2* expression in
863 activated human CD4⁺ T cells. RT-qPCR experiments were performed to analyse *IL2*
864 expression upon PMA/Ionomycin activation (left panel) or upon stimulation with anti-
865 CD3/CD28 antibodies (right panel). These results are presented in two distinct panels due to
866 very different thresholds of induction. (D, E and F) Relative occupancy of BCL11B, MTA1
867 and P300 on the *IL2* promoter after human CD4⁺ T-cell activation. Levels of BCL11B (D),
868 MTA1 (E) and P300 (F) binding in resting or in anti CD3/CD28-activated human CD4⁺ T
869 cells were assessed by ChIP-qPCR experiments in triplicate. Error bars indicate standard
870 deviation. (G) Working model depicting the impact of BCL11B Serine 2 phosphorylation on
871 the transcriptional regulation of *IL2* and *Id2* (see also Discussion). *Panel 1:* In human un-
872 stimulated CD4⁺ T cells isolated from PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) of
873 healthy donors, BCL11B is bound together with MTA1 and NuRD complex to repress
874 transcription of its direct target genes such as *IL2* and *Id2*. *Panel 2:* Upon activation of CD4⁺
875 T cells, a rapid and transient phosphorylation of Serine 2 in the conserved N-terminal

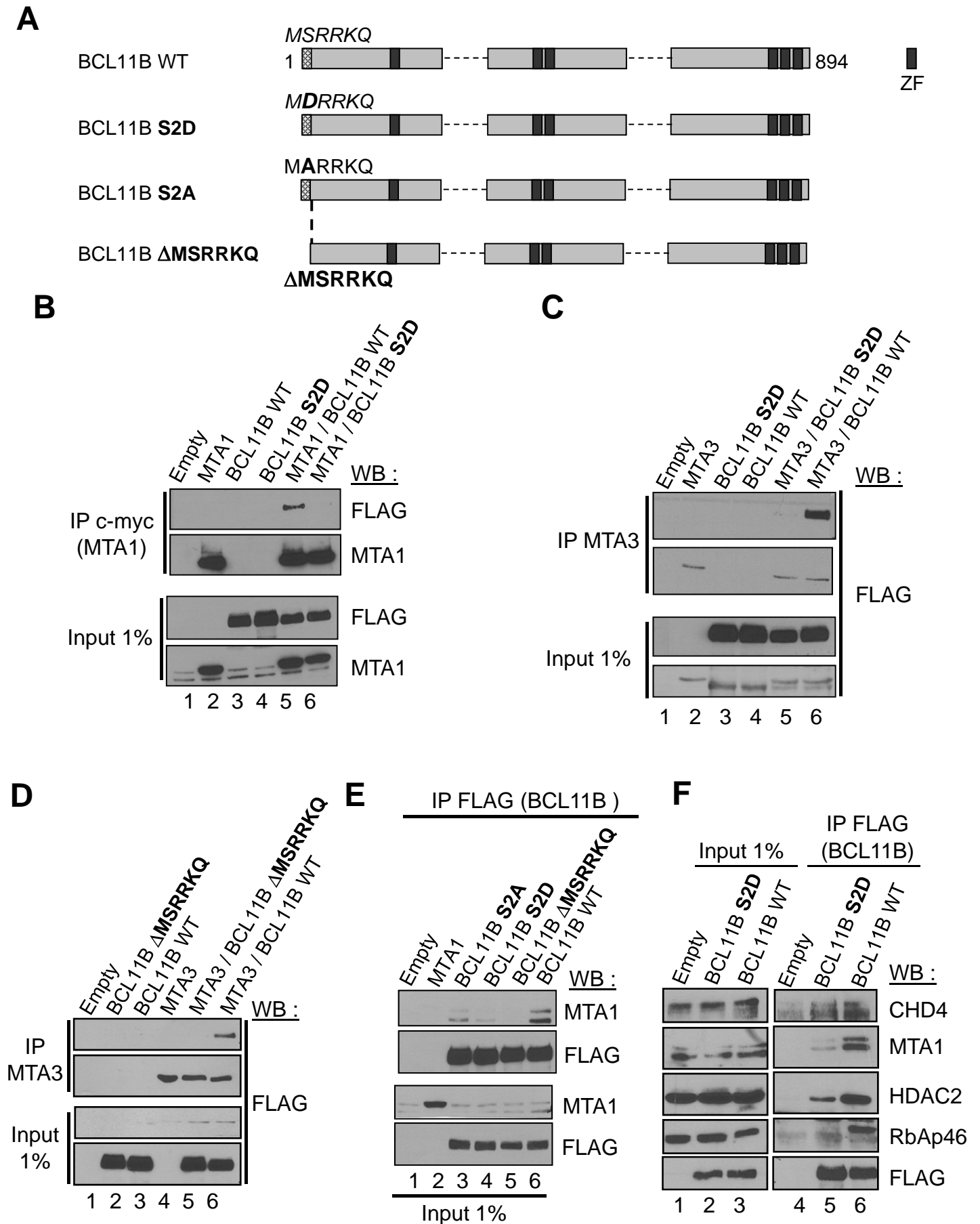
876 repression domain allows disruption of the interaction with MTA1 and hence NuRD
877 repressive complex while BCL11B remains bound to the *IL2* and *Id2* promoters. *Panel 3:*
878 Then, a concomitant SUMOylation on Lysine K679 in the C-terminal end of BCL11B allows
879 the recruitment of P300 to activate transcription. *Panel 4:* After two to five hours of treatment,
880 a transcriptional down-regulation of *BCL11B* would stop and/or limit the *IL2* and *Id2*
881 activation.



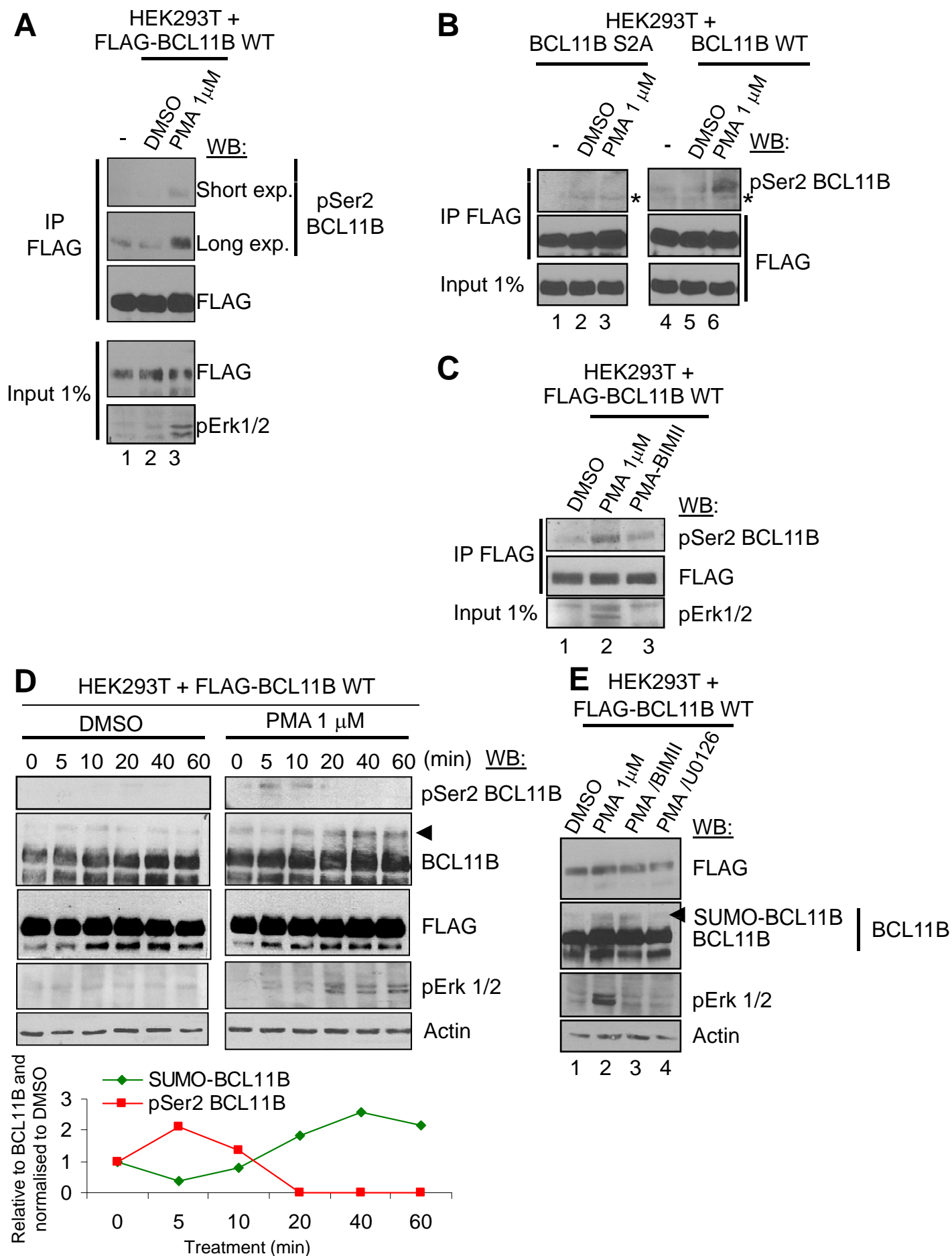
Dubuissez et al., Figure 1



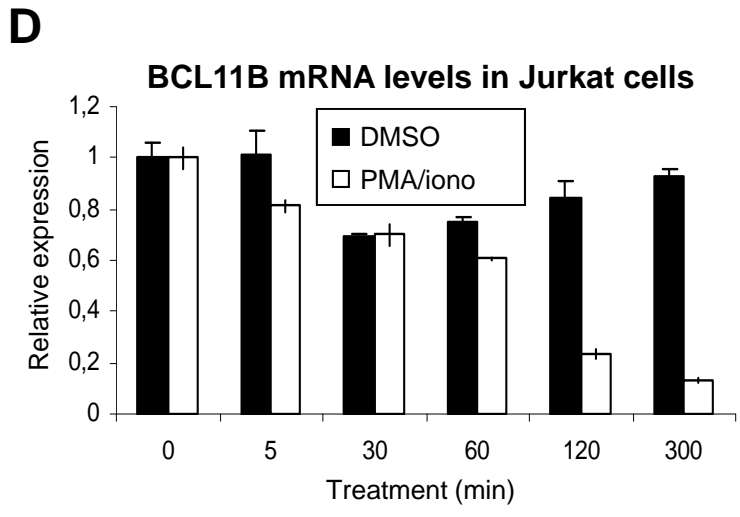
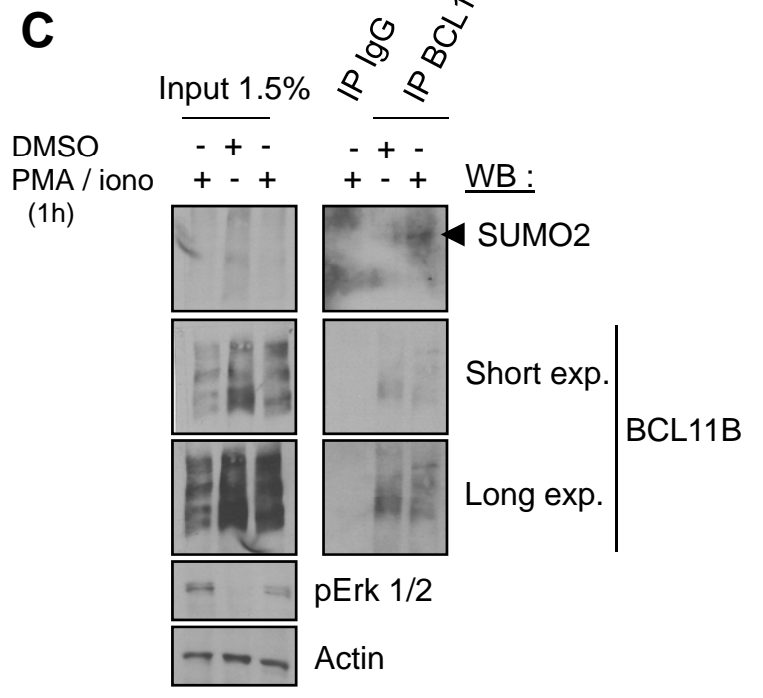
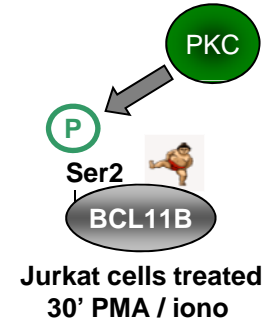
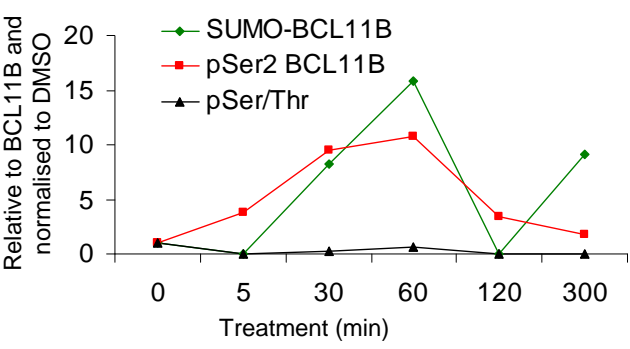
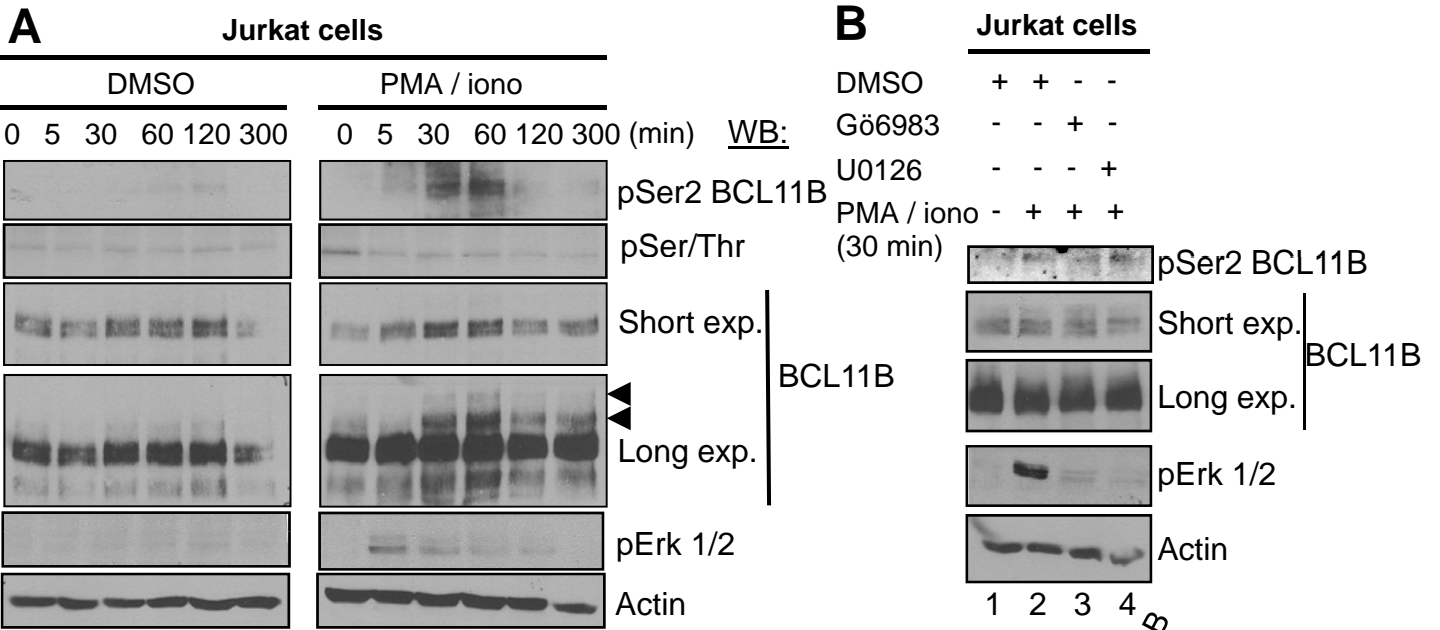
Dubuissez et al., Figure 2



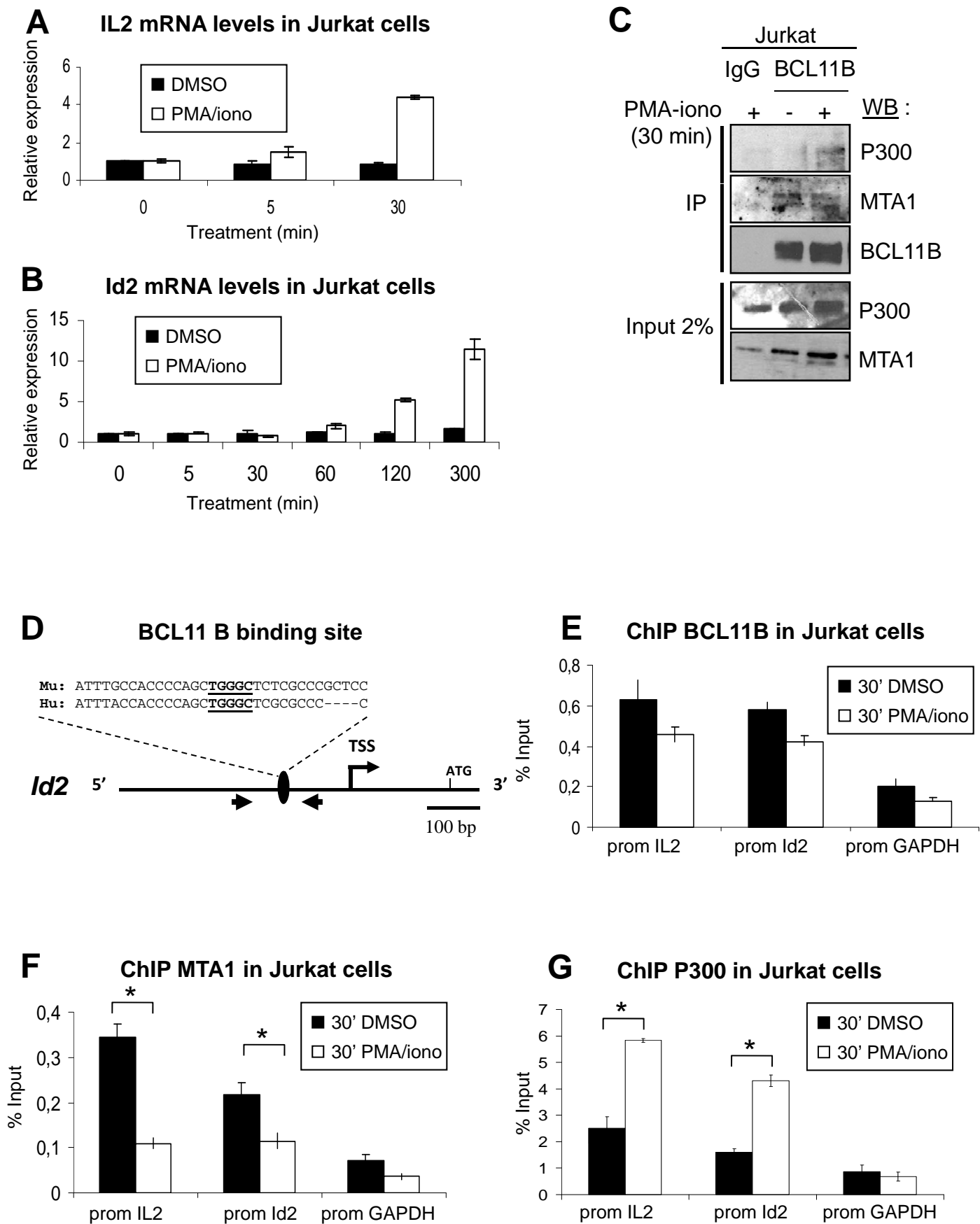
Dubuissez et al., Figure 3

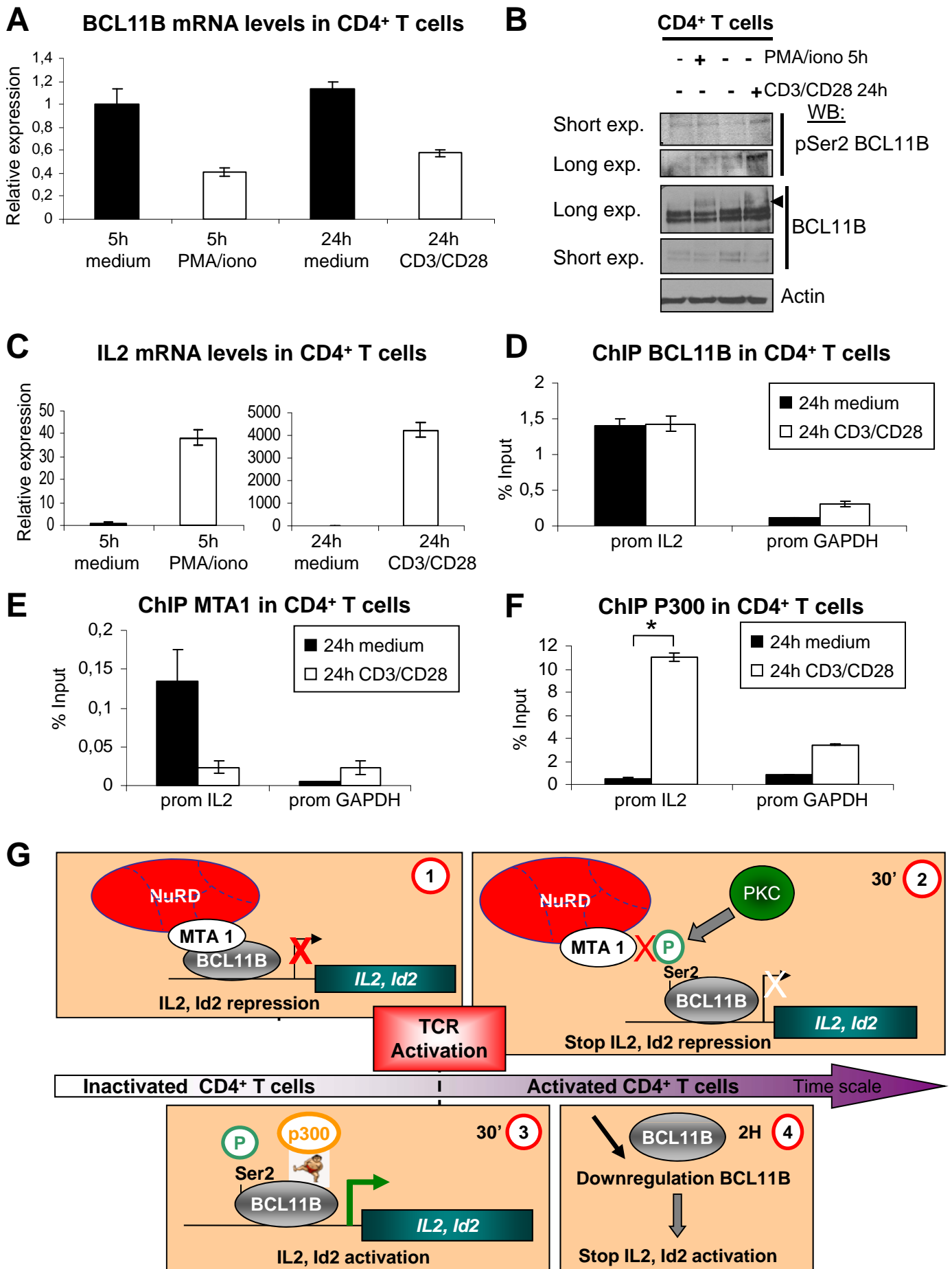


Dubuissez et al., Figure 4



Dubuissez et al., Figure 5





Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1 (related to Figure 1): **BCL11A and BCL11B interact with MTA1 and MTA3.** (A) Endogenous BCL11B proteins interact with endogenous MTA1 proteins in Jurkat cells. Jurkat whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with total IgG and with anti-MTA1 antibodies and immunoblotted with polyclonal antibodies against BCL11B to detect co-immunoprecipitation (left panels, **IP**). The membrane was then stripped and re-probed with anti-MTA1 antibodies to verify the presence of MTA1 proteins. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-BCL11B antibodies (Left panel, **INPUT**). (B) BCL11B interacts with MTA3. A similar experiment was conducted in Jurkat cells with anti-MTA3 antibodies. (C, D, E, F) Expression levels of the two *BCL11* paralogs, *BCL11A* and *BCL11B* and of the *MTA1* and *MTA3* corepressors in MOLT4 and Jurkat cells. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression levels of *BCL11A* (C), *BCL11B* (D), *MTA1* (E) and *MTA3* (F) in MOLT and Jurkat cells (G) BCL11A interacts with MTA1. HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated plasmids and the empty pcDNA3-FLAG vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-MTA1 antibodies (Top panels, **IP MTA1**) and immunoblotted with polyclonal antibodies against BCL11A to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-MTA1 antibodies to verify the presence of MTA1 proteins in the immunoprecipitates. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Lower panels, **INPUT**). (H) BCL11A interacts with MTA3. A similar experiment was conducted in HEK293T cells with BCL11A and MTA3 expression vectors.

Supplemental Figure 2 (related to Figure 2): **The various BCL11B-Gal4-NLS-HA constructs display a diffuse nuclear localization whereas the various FLAG-BCL11B mutants display a punctuated nuclear localization.** (A) HEK293T were mock-transfected or transfected with the indicated expression vectors for the various BCL11B N-terminal fragments cloned in frame with the Gal4 binding domain, a Nuclear localization signal (NLS) and an epitope tag (HA) in the Gal4-NLS-HA vector used in the co-immunoprecipitation experiments and in the luciferase reporter assays. 48 hours after transfection, cells were fixed with paraformaldehyde and analysed by conventional immunofluorescence microscopy using anti-HA monoclonal antibodies. Nuclei are seen as Hoechst-positive staining. The merging of the two images is shown in the right-hand panels.

(B) HEK293T cells were transiently transfected with expression vectors for wt FLAG-tagged-BCL11B or for the various BCL11B mutants (S2D, S2A and Δ MSRRKQ) used in the co-immunoprecipitation experiments. Immunofluorescence microscopy analyses using the anti-FLAG monoclonal antibodies were performed as described above.

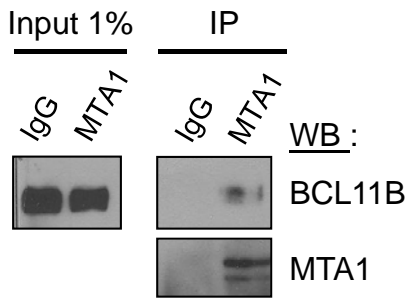
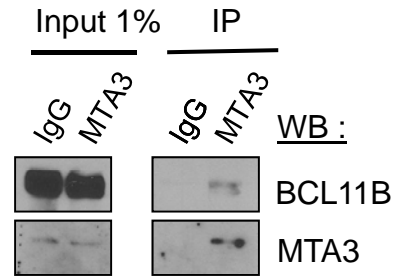
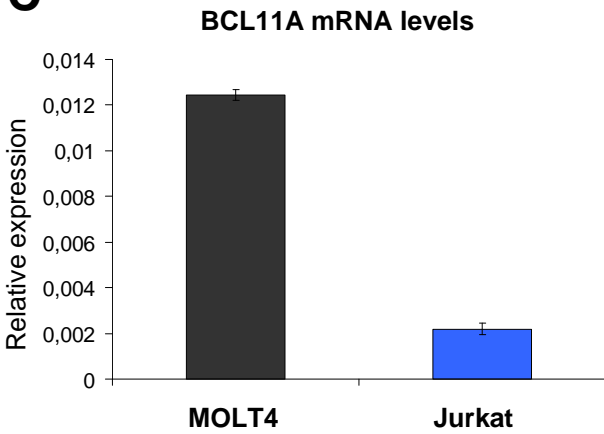
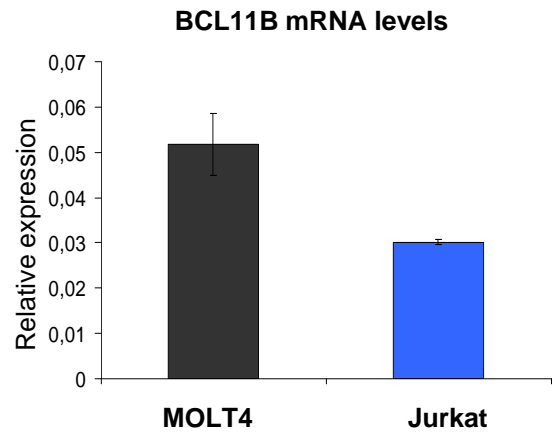
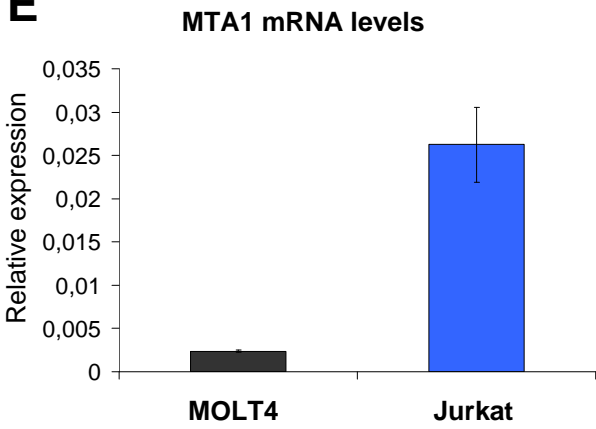
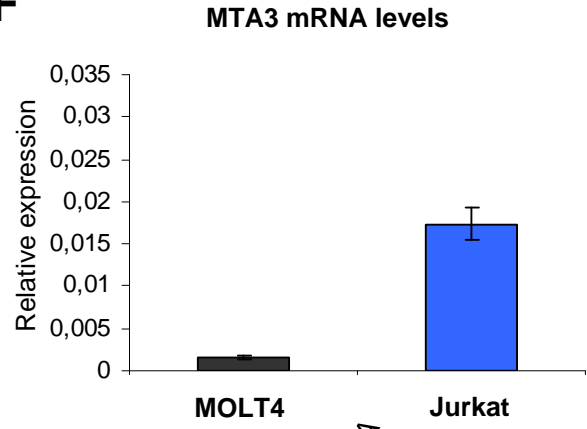
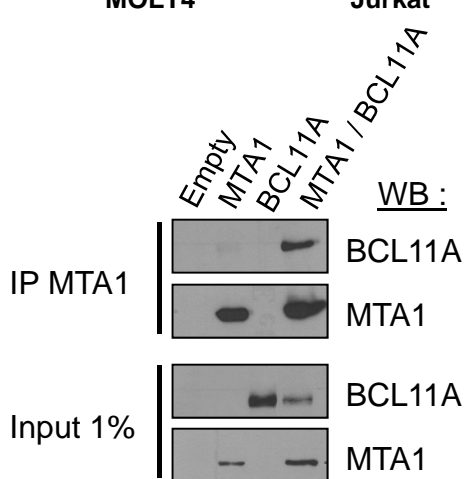
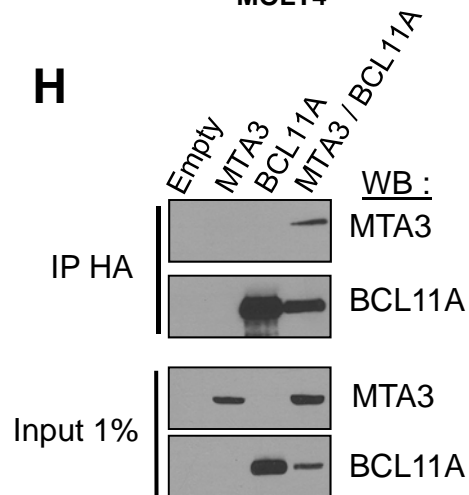
Supplemental Figure 3 (related to Figure 6 for panels A and B and to Figure 7 for panel C): **Expression levels of *IL2* and *MTA1* in activated Jurkat or in purified human CD4⁺ T cells** (A) Prolonged Activation of the human CD4⁺ T cell line Jurkat by PMA/Ionomycin induced a huge increase of *IL2* expression. Jurkat cells were treated with DMSO or activated with PMA/Ionomycin for the indicated times. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to analyse the increase of *IL2* expression levels after activation of Jurkat cells. These results correspond to the experiment shown as Figure 6A but presented with a different scale to visualize the huge expression of *IL2* mRNAs levels after 2 and 5 hours of activation. (B) *MTA1* RNAs levels are slightly activated during PMA/Ionomycin

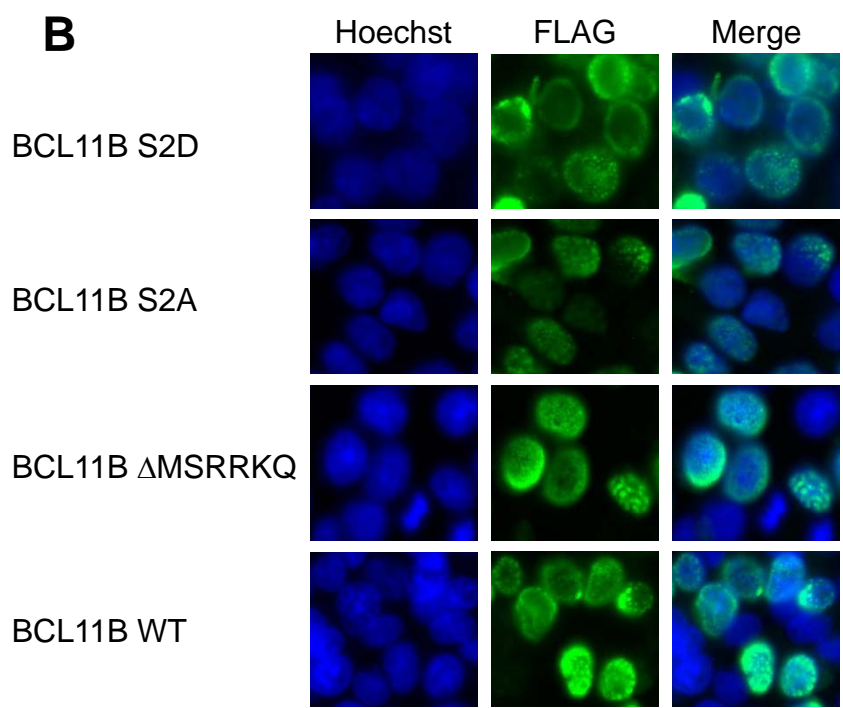
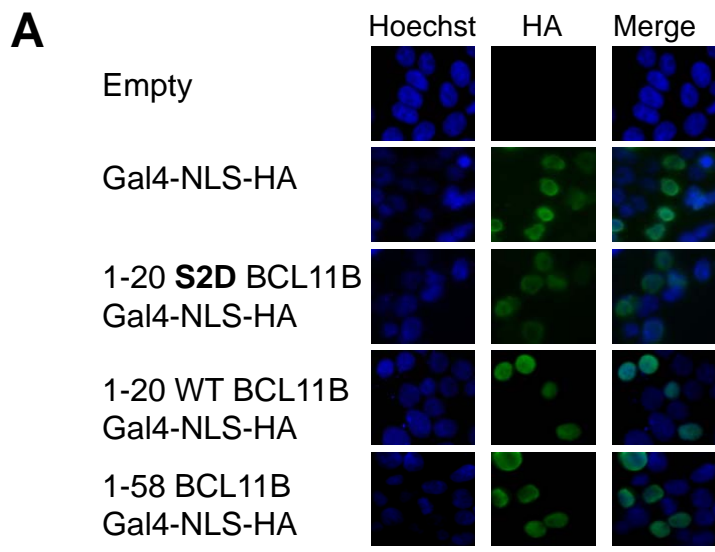
activation of Jurkat cells. The mRNAs samples used in panel A (Figure 6A) were also analyzed by RT-qPCR for the expression of MTA1. (C) Activation of purified primary human CD4⁺ T cells by PMA/Ionomycin or by anti CD3/CD28 induced a slight increase of MTA1 expression as measured by RT-qPCR analyses. RT-qPCR experiments were performed to analyse MTA1 expression in the mRNAs samples used in Figures 7A and 7C.

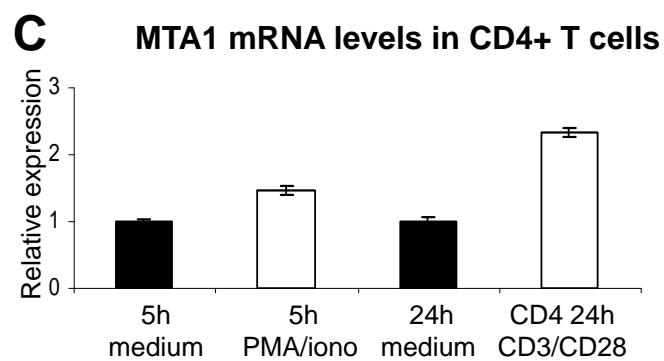
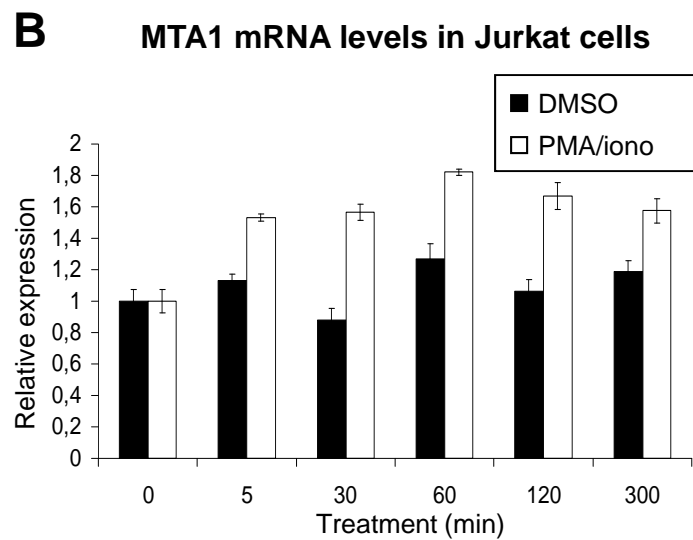
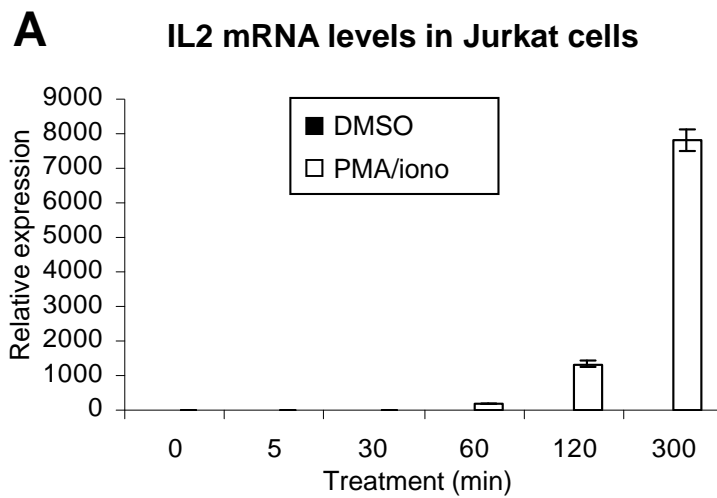
Supplementary Figure 4 (related to Figure 6): ChIP experiments on the *IL2* and *Id2* promoters in un-stimulated Jurkat cells.

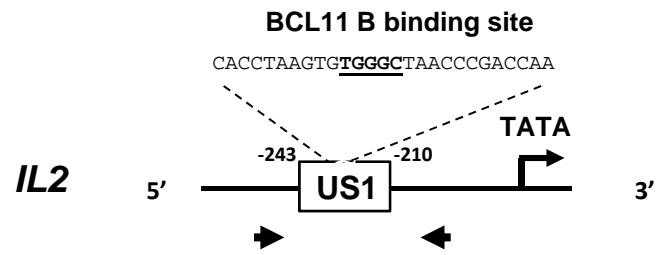
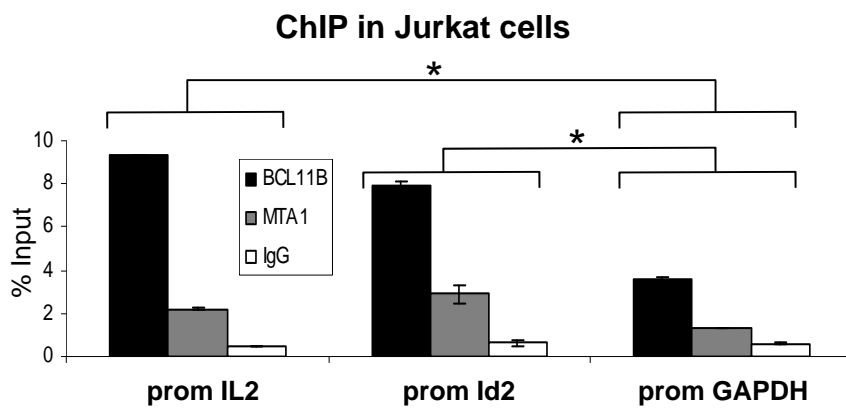
(A) Schematic drawing of the human *IL2* proximal promoter region. The TATA box as well as the region between -243 and -201, named the upstream site 1 (US1) are represented as described in Cismaciu et al. (2006) (20). The BCL11B binding site contained in this region is shown with the **TGGGC** core sequence highlighted in bold and underlined. The oligonucleotides used in the ChIP experiments are schematically shown by arrows

(B) Pilot ChIP experiments were performed on chromatin prepared from Jurkat cells grown in standard conditions with antibody against BCL11B, MTA1, CHD4 or P300 on chromatin prepared as previously described (28). The bound material was eluted and analysed by quantitative PCR using primers flanking the US1 BCL11B binding site identified in the human *IL2* promoter (20) and a newly identified core TGGGC BCL11B binding site (-316 to -312) located upstream of the transcription start site (TSS) in the human *Id2* gene (see Figure 6D). *GAPDH* was used as an internal nonbinding control.

A**B****C****D****E****F****G****H**





A**B**

BCL11B	forward	CCCAGAGGGAGCTCATCAC
	reverse	ACTTGGCTCCTCTATCTCCAGAC
IL2	Forward	TGGAGCATTACTGCTGGATTT
	Reverse	TGTGAGCATCCTGGTGAGTTT
Id2	Forward	ACCACCCTCAACACGGATAT
	Reverse	CACACAGTGCTTTGCTGTCATT
MTA1	Forward	TGCTCAACGGGAAGTCCTACC
	Reverse	GGCCATGTAGAACACGTCATC
18S	forward	GGCGCCCCCTCGATGCTCTTAG
	reverse	GCTCGGGCCTGCTTTGAACACTCT

Table S1 : primers used in RT-qPCR experiments.

IL2	forward	AAGGCGTTAATTGCATGAATTAGA
	reverse	AAAGACTGACTGAATGGATGTAGG
Id2	Forward	GCCAGCCCCGCACTTACT
	Reverse	GGTTCTTCCGCGTTCGCA
GAPDH	forward	GCGTGCCCAGTTGAACCA
	reverse	CGCCCGTAAAACCGCTAGT

Table S2 : primers used in ChIP-qPCR experiments.

Expériences en cours pour la version révisée de l'article à *Molecular and Cellular Biology*

Les figures existantes ont été améliorées et de nouveaux résultats ont été obtenus pour répondre aux remarques des reviewers. De manière générale, nous avons effectué des études statistiques par test de Student pour les résultats des expériences des tests de transactivation luciférase, des RTqPCR et des ChIPqPCR. Au niveau des Western Blot montrant la phosphorylation et/ou la SUMOylation de BCL11B, les marqueurs de poids moléculaire ont été ajoutés. De plus, la représentation des résultats de ChIPqPCR a été modifiée afin de montrer les résultats des ChIP obtenus avec les IgG contrôles. Nous les avons donc représentés non plus par protéine immunoprécipitée (ChIP) mais par promoteur ciblé. Seules les nouvelles expériences seront décrites précisément :

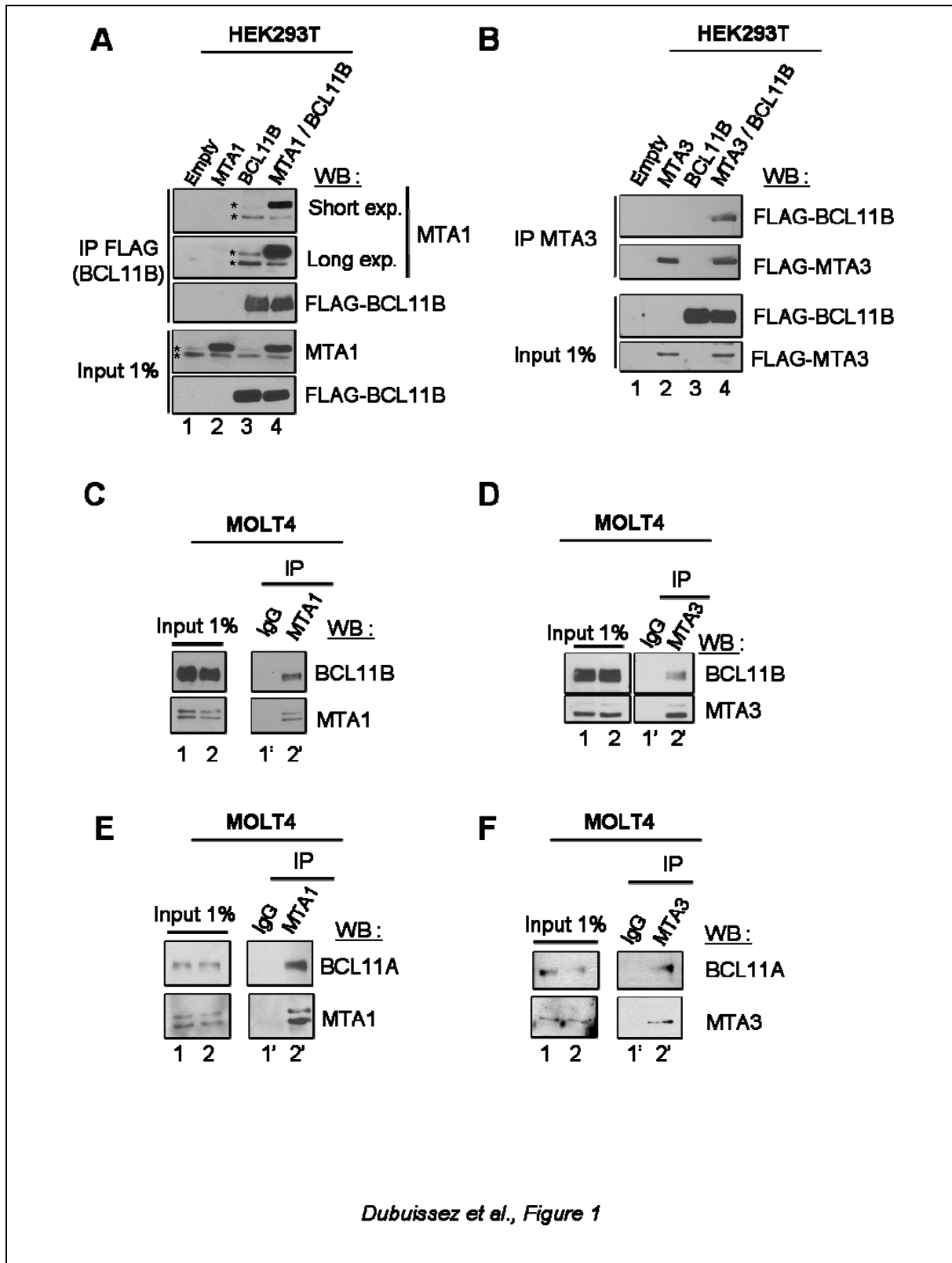
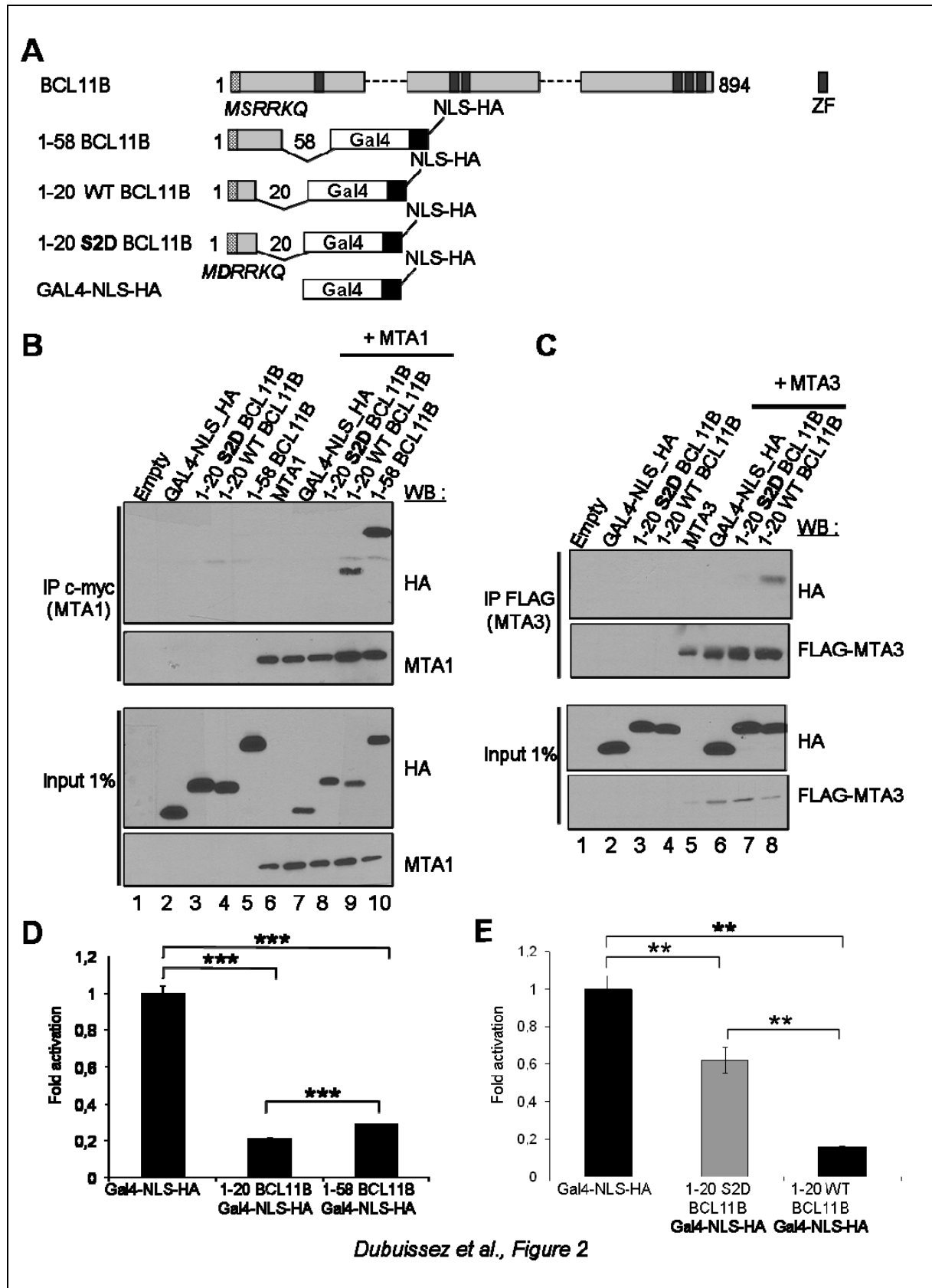


Figure 1 :

La figure 1A a été répétée afin d'avoir une exposition non saturée de l'IP FLAG (BCL11B) et les Input MTA3 de la Figure 1B ont été ajoutés.

Pour améliorer la qualité des expériences de Co-IP entre les protéines endogènes BCL11A, BCL11B et MTA3 dans les cellules MOLT4, nous avons acheté un autre anticorps anti-MTA3 afin de réaliser une immunoprécipitation plus efficace (Figures 1D et 1F). Jusqu'à ce jour, seule la Co-IP entre BCL11B et MTA3 a pu être réalisée avec ce nouvel anticorps (Figure 1D). De plus, en Supplementary Figure 1A et 1B, les expériences de Co-IP dans les cellules Jurkat ont également été répétées et réalisées en configuration inverse (IB BCL11B et WB MTA1) pour valider les interactions entre les protéines endogènes BCL11B et MTA1.



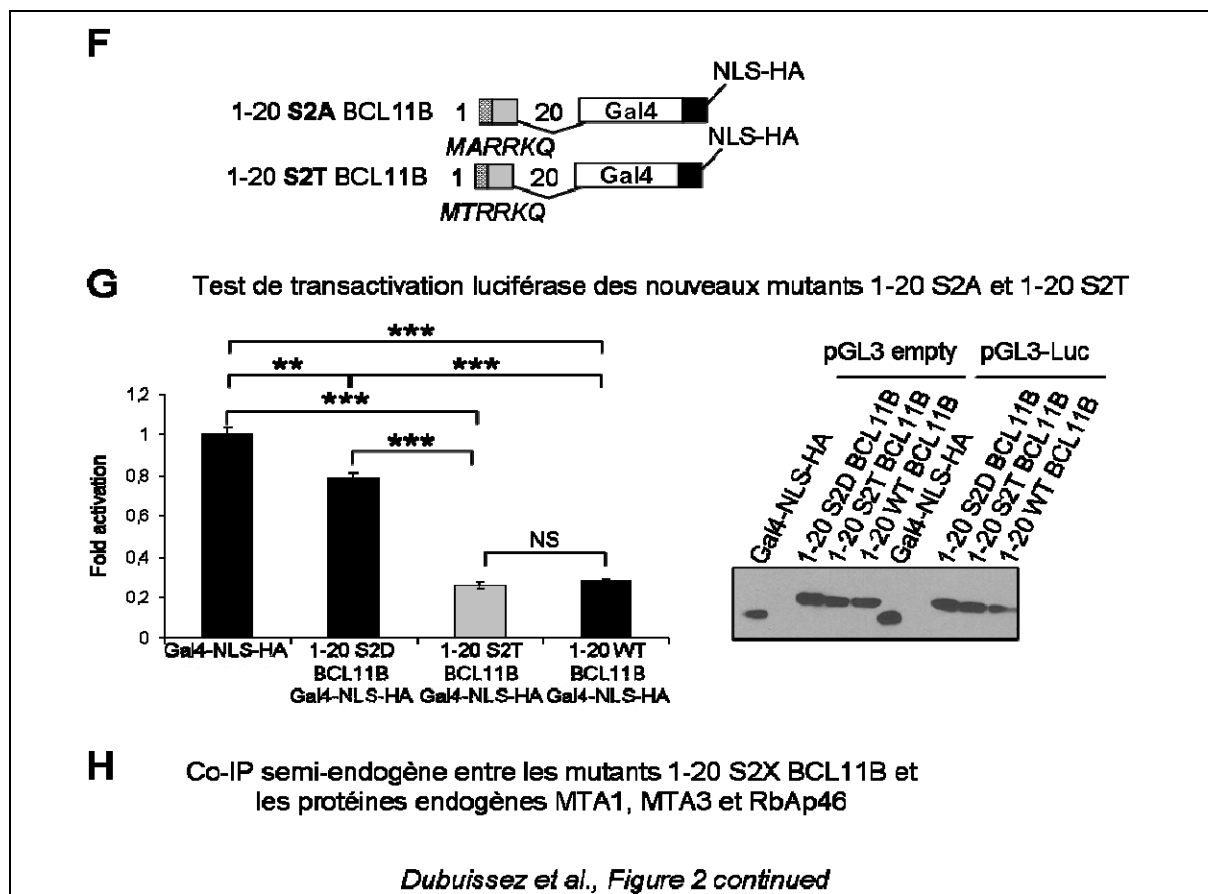


Figure 2 :

Nous avons ajouté les Western Blots correspondant aux productions de plasmides codant les constructions de BCL11B utilisés lors des tests de transactivation luciférase des Figures 2D et 2E en Supplementary figures 2C et 2D. Nous observons que toutes les différentes chimères entre le DBD de Gal4 et les fragments de BCL11B sont produits de manière similaire.

De plus, deux nouveaux mutants ont été créés : 1-20 S2A BCL11B et 1-20 S2T BCL11B (Figure 2F) afin de déterminer si les effets observés avec le mutant 1-20 S2D ne sont pas dus à la mutation de la Sérine, elle-même. Les expériences de Co-IP entre les mutants 1-20 S2X BCL11B et les protéines endogènes MTA1, MTA3 et RbAp46 sont en cours de réalisation ainsi que les tests de transactivation luciférase. Des résultats préliminaires de test de transactivation montrent que le mutant 1-20 S2T réprime autant que le fragment 1-20 WT (Figure 2G) ce qui indique que la mutation de la Sérine en un acide aminé similaire, ici la Thréonine, n'impacte pas sur le pouvoir répresseur du motif N-terminal de BCL11B et traduit donc l'importance du groupement hydroxyle.

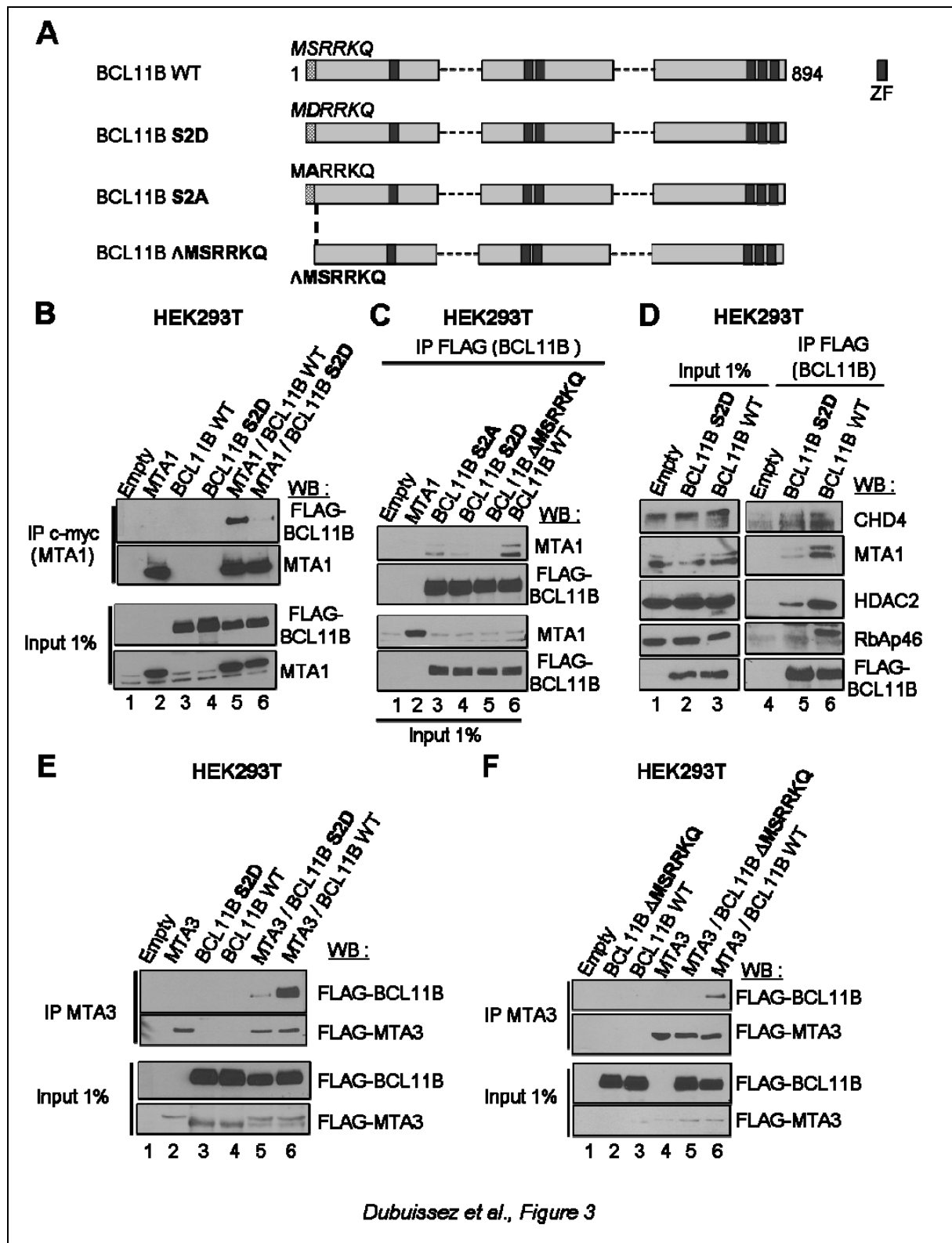


Figure 3 :

Les figures ont été ré-organisées pour regrouper les expériences de Co-IP avec MTA1 au centre (Figures 3B, C et D) et celles avec MTA3 en bas (Figures 3E et F) afin de faciliter la lecture des résultats. Une exposition plus longue du panneau FLAG-BCL11B de la Figure 3B remplace la précédente afin de montrer que le mutant BCL11B S2D est toujours capable d'interagir faiblement avec les protéines MTA1 surexprimées (ligne 6) comme il est observé avec les protéines MTA1 endogènes sur la Figure 3C (ligne 4). Il en est de même pour la Figure 3E où une faible interaction existe entre le mutant BCL11B S2D et MTA3 (ligne 5). De plus, nous allons répéter la figure 3D en ajoutant le mutant BCL11B S2A afin de tenter d'expliquer pourquoi ce mutant interagit moins efficacement que BCL11B WT avec MTA1 endogène sur la Figure 3C, lignes 3 et 6. Comme observé sur la Figure 3D, lignes 5 et 6, les protéines endogènes RbAp46 ne co-immunoprécipitent plus du tout avec le mutant BCL11B S2D comparé au BCL11B WT. Dans le cas de FOG1, le motif N-terminal conservé est impliqué dans l'interaction avec MTA1 et avec RbAp48 et notamment la Sérine 2 par liaison hydrogène (Lejon et al., 2011). Si nous supposons qu'il en est de même pour le motif N-terminal de BCL11B, il est donc très intéressant d'étudier l'interaction entre BCL11B S2A et RbAp46. En effet, nous pourrions très bien imaginer que ce mutant n'est plus capable d'interagir avec RbAp46 ce qui déstabiliserait l'interaction avec le complexe NuRD (cf Discussion générale).

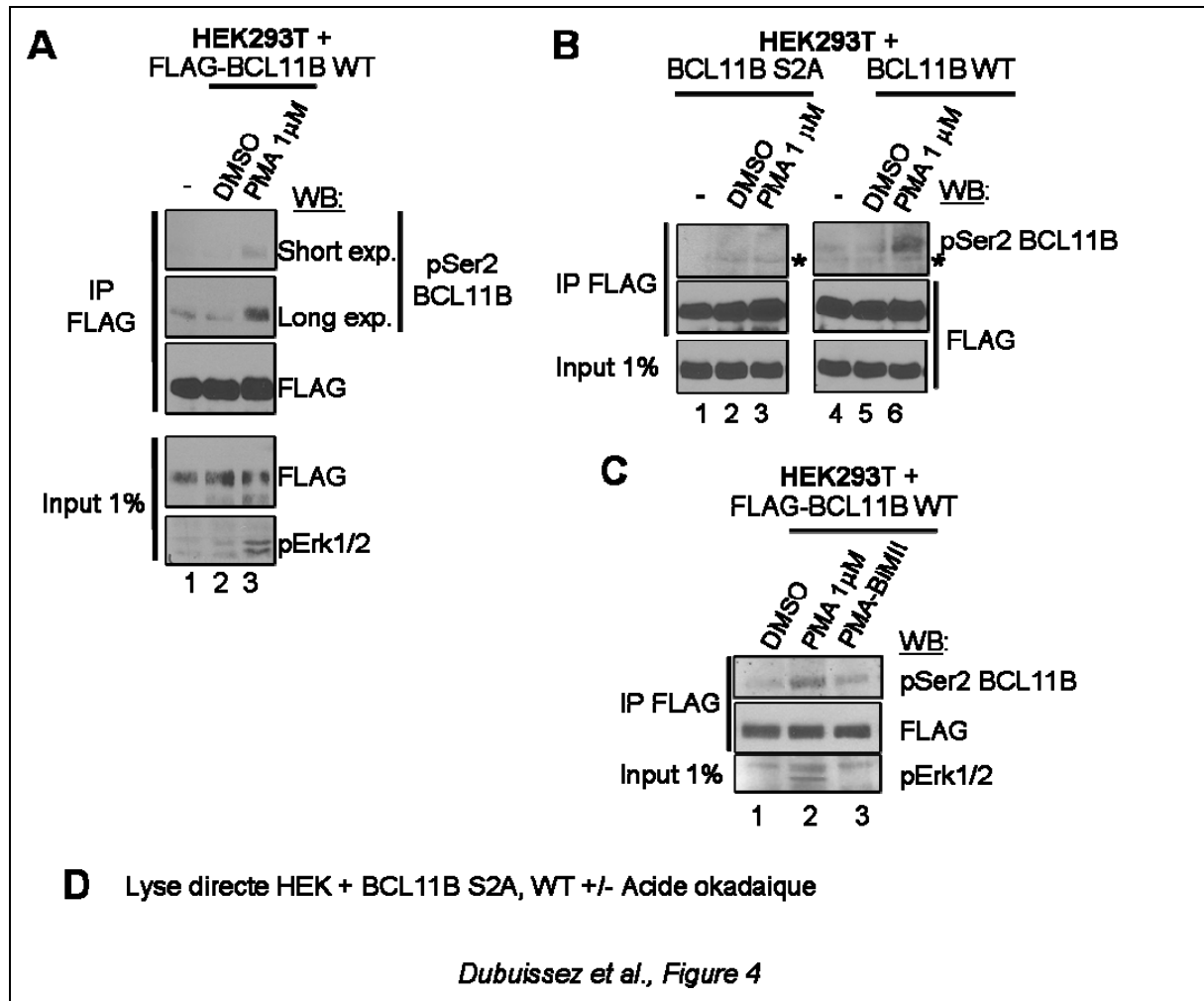


Figure 4 :

La Figure 4 de la première version de l'article a été scindée en deux figures : la Figure 4 de la version récente concerne exclusivement la mise en évidence de la phosphorylation endogène de la Sérine 2 de BCL11B *in vitro* alors que la nouvelle Figure 5 décrit la SUMOylation de BCL11B observée *in vitro*.

Dans le cas de la cinétique de traitement au PMA des cellules HEK293T surexprimant BCL11B qui permet d'aborder la phosphorylation de la Sérine 2 et la SUMOylation de BCL11B *in vitro*, l'apparition de la phosphorylation de la Sérine 2 et de la SUMOylation de BCL11B n'est pas concomitante comme dans la cinétique d'activation des cellules Jurkat de la Figure 6A, précédemment 5A. Ce système de surexpression étant moins informatif que les modifications de protéines endogènes en Jurkat, il a été déplacé en Supp. Figure 3A. Une quantification de l'expression de BCL11B a également été réalisée pour déterminer si l'augmentation de la SUMOylation de BCL11B n'était pas due à l'augmentation de son expression au cours du traitement (Supp. figure 3B). De plus, afin de conforter la Figure 4B qui montre la spécificité de notre anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la Sérine 2 de BCL11B, nous allons réaliser une expérience de lyse directe de cellules HEK293T surexprimant soit BCL11B S2A, soit BCL11B WT et traitées ou non avec un inhibiteur de phosphatases, l'acide okadaïque (Cohen et al., 1990). Nous devrions observer la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B uniquement dans les cellules surexprimant BCL11B WT et traitées à l'acide okadaïque. Enfin, la Figure 4E a été déplacée en Figure 5B. La Figure 4 permet de montrer l'existence de la phosphorylation endogène de la Sérine 2 de BCL11B *in vitro* et de valider la spécificité de notre anticorps dirigée contre la forme phosphorylée de la Sérine 2.

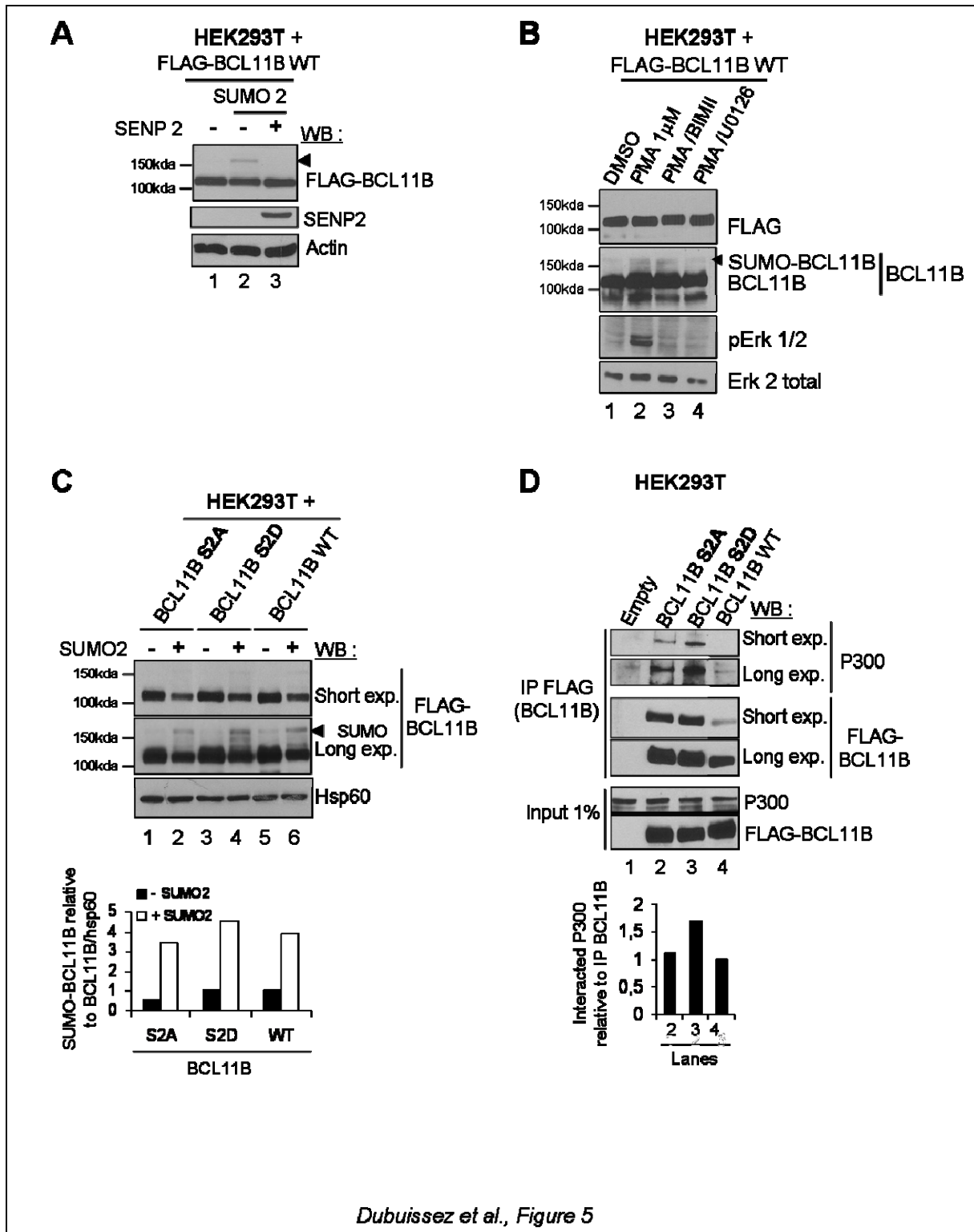


Figure 5 :

La Figure 5 précédente a été déplacée en Figure 6, la nouvelle figure 5 permet dans un premier temps, de valider la bande supérieure de BCL11B observée dans la cinétique de traitement des HEK293T comme étant la forme SUMOylée de BCL11B et dans un second temps, d'aborder la SUMOylation potentielle des mutants ponctuels BCL11B S2A et S2D et leur interaction avec P300. Nous observons que la bande supérieure de BCL11B apparait en présence des protéines SUMO2 surexprimées et disparaît lorsque la déSUMOylase SENP2 est également surexprimée (Figure 5A, lignes 2 et 3, flèche noire). Cette bande supérieure de BCL11B correspond donc à la forme SUMOylée de BCL11B *in vitro* observée aussi dans des cellules traitées au PMA (Figure 5B, ligne 2). Puis, nous avons déterminé si les mutants BCL11B S2A et S2D pouvaient être SUMOylés. Pour cela, nous les avons surexprimés en présence ou absence des protéines SUMO2 dans des cellules HEK293T. Nous montrons que les deux mutants ponctuels sont SUMOylés en présence de protéines SUMO2 de la même façon que BCL11B WT (Figure 5C, lignes 2, 4 et 6, graphe). Enfin, la SUMOylation de BCL11B favorisant l'interaction avec P300 dans les thymocytes murins (Zhang et al., 2012b), nous avons réalisé une expérience de Co-IP entre les mutants de BCL11B et P300. Nous montrons que les deux mutants BCL11B S2A et S2D interagissent tous deux avec les protéines P300 endogènes comme BCL11B WT (Figure 5D, lignes 2-4). De plus, après quantification de l'interaction entre BCL11B S2A, S2D, WT et P300, nous observons que les protéines P300 endogènes co-immunoprécipitent plus efficacement avec le mutant BCL11B S2D (Figure 5D, graphe). Ce résultat suggère que la phosphorylation de la Sérine 2 mimée par la mutation S2D favorise l'interaction avec P300 ce qui est cohérent avec une diminution de l'interaction avec MTA1 (Figure 3B, C et D).

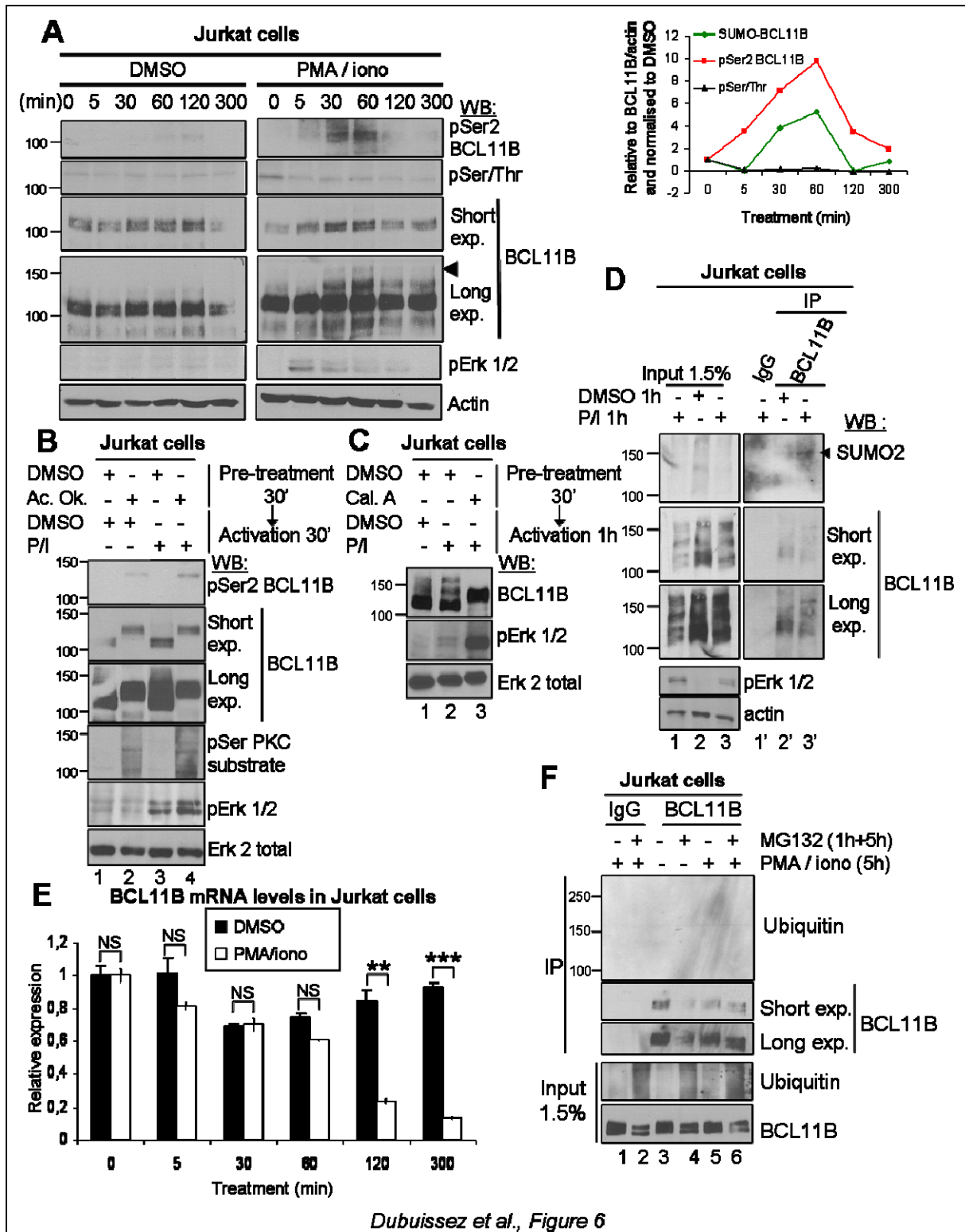
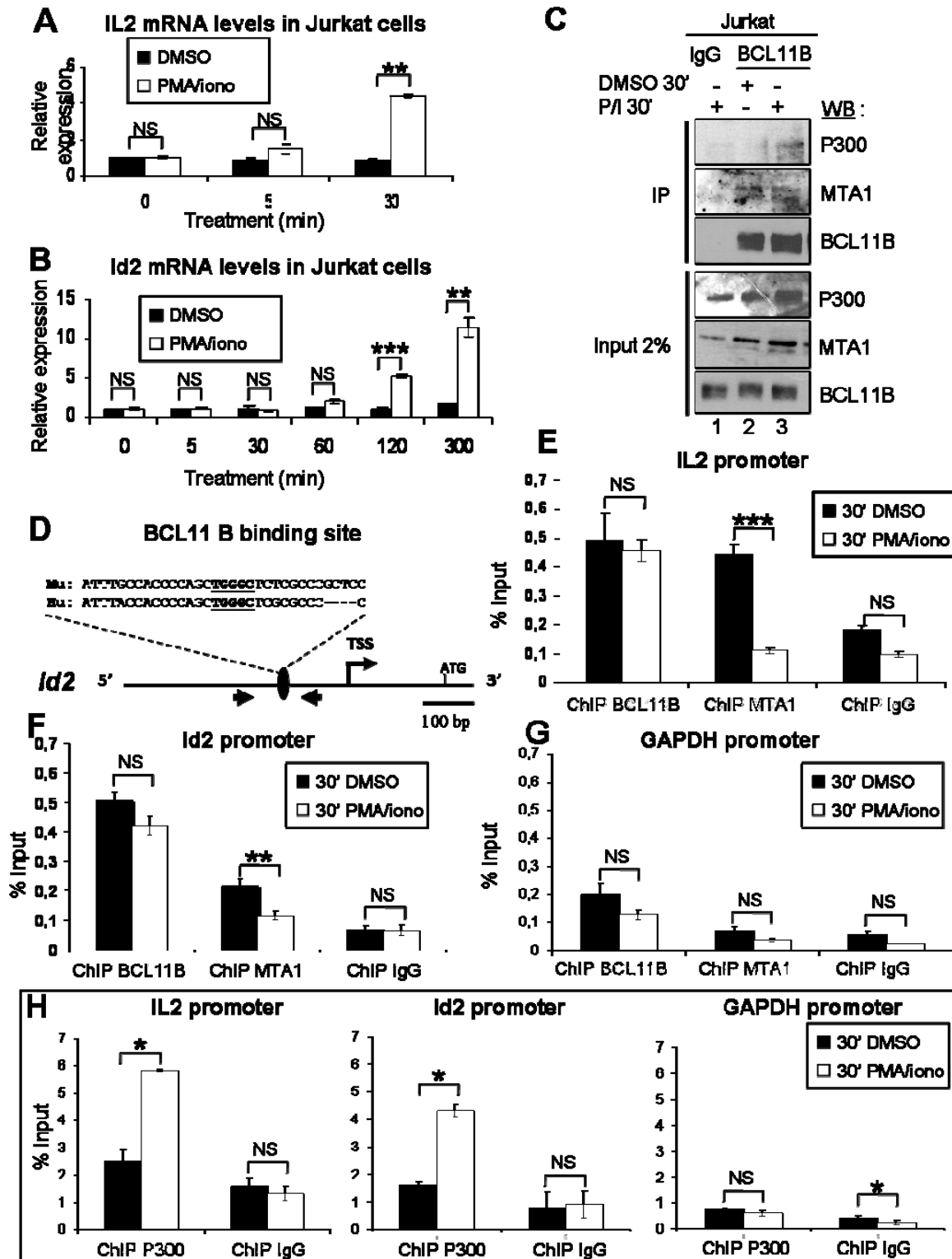


Figure 6 :

Afin de déterminer si la SUMOylation de BCL11B observée au cours de la cinétique d'activation au PMA/iono n'était pas due à une augmentation de l'expression de BCL11B, nous avons quantifié l'expression de BCL11B (faible expo.) par rapport à l'actine (Sup. Figure 3C). Puis, pour prouver que la

bande détectée avec notre anticorps pSer2 BCL11B correspond à la forme phosphorylée des protéines BCL11B endogènes, nous avons réalisé une lyse directe de cellules Jurkat traitées ou non avec l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases et activées ou non 30 min au PMA/iono (Figure 6B). Nous observons un « shift » de BCL11B dans les conditions traitées avec l'acide okadaïque qui correspond certainement à la forme hyperphosphorylée de BCL11B (Figure 6B, lignes 2 et 4). Nous détectons également la forme phosphorylée de la Sérine 2 de BCL11B dans ces deux conditions qui augmente en cas d'activation au PMA/iono des cellules Jurkat (Figure 6B, lignes 2 et 4). L'ancienne Figure 5B a été répétée et déplacée dans la nouvelle Figure 8 qui sera décrite prochainement. Puis, en ce qui concerne la SUMOylation de BCL11B endogène, il nous a été demandé de reproduire la Figure 5C précédente déplacée en Figure 6D afin de montrer une IP BCL11B plus convaincante (Figure 6D, lignes 2' et 3'). En attente d'un meilleur résultat et afin de conforter cette expérience, nous avons réalisé une lyse directe de cellules Jurkat traitées ou non avec la Calyculin A, un inhibiteur de SUMOylation (Li et al., 2015) et activées ou non 1h au PMA/iono (Figure 6C). Nous observons que les bandes supérieures à BCL11B en condition PMA/iono disparaissent en présence de la Calyculin A (Figure 6C, lignes 2 et 3). Ce résultat confirme que les bandes supérieures à BCL11B correspondent aux formes SUMOylées de BCL11B endogène. La Figure 5D a été déplacée en Figure 6E. Enfin, il nous a été demandé de déterminer si, en plus de la répression transcriptionnelle de BCL11B observée à 5h PMA/iono en Figure 6E, il y a aussi de la dégradation protéique de BCL11B. Nous avons donc réalisé une expérience préliminaire d'immunoprécipitation de BCL11B dans des cellules Jurkat activées à 5h PMA/iono en présence ou absence d'inhibiteur du protéasome MG132 (Figure 6F, lignes 5 et 6). Nous n'observons aucune forme ubiquitinylée de BCL11B en présence du MG132. En revanche, nous n'avons pas de protéines ubiquitinylées comme contrôle positif pour valider notre expérience. Pour y remédier, nous allons reproduire cette expérience en immunoprécipitant également la cycline D1 qui sera notre contrôle positif.



Dubuissez et al., Figure 7

Figure 7 :

La Figure 7 correspond à l'ancienne Figure 6. La qualité de l'expérience de Co-IP entre BCL11B et MTA1 dans les cellules Jurkat activées ou non 30 min au PMA/iono n'étant pas optimale, nous essayons d'améliorer le protocole pour observer une nette diminution de l'interaction entre BCL11B et MTA1 (Figure 7C, lignes 2 et 3). En effet, au niveau du ChIPqPCR et contrairement aux Co-IP réalisées dans les mêmes conditions, nous observons une diminution significative de la fixation de MTA1 sur les promoteurs de l'IL2 et de l'Id2 dans les cellules Jurkat activées 30 min au PMA/iono (Figure 7E, F).

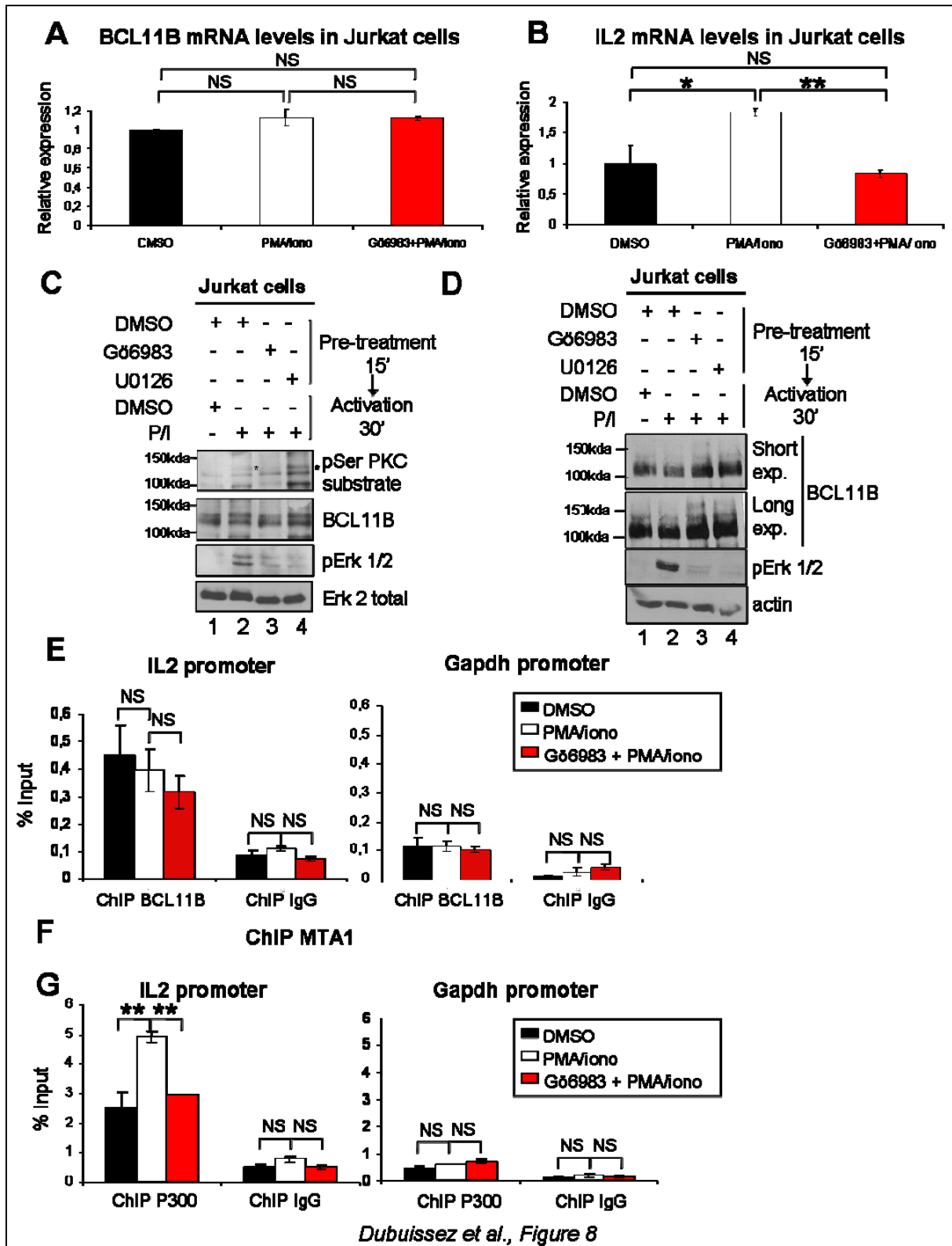


Figure 8 :

Un point majeur commun aux trois reviewers est de montrer les effets de la surexpression des mutants BCL11B S2D et S2A sur l'activation des cellules Jurkat. Pour cela, BCL11B étant surexprimée dans les Jurkat, il faudrait inhiber l'expression de BCL11B endogène par shRNA avant de surexprimer les mutants ponctuels de BCL11B. Or, plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'expression de BCL11B provoque l'arrêt de leur prolifération et induit l'apoptose des cellules Jurkat (Huang et al., 2011; Wakabayashi et al., 2003b). Pour tenter de répondre à ce point important, nous avons réalisé les expériences de RTqPCR et ChIPqPCR dans des cellules traitées ou non avec un inhibiteur spécifique de la PKC, Gö6983. Nous constatons que l'inhibiteur de la PKC ne module pas l'expression de BCL11B ni au niveau ARN, ni au niveau protéique (Figure 8A, C et D). En revanche, il empêche l'induction de l'expression de l'IL2 observée lors de l'activation des Jurkat au PMA/iono (Figure 8B). De plus, nous n'observons plus la forme phosphorylée de la Sérine 2 de BCL11B dans des cellules activées 30 min au PMA/iono en présence de l'inhibiteur de PKC, Gö6983 (Figure 8C, lignes 2 et 3, panneau pSer PKC substrate *). N'étant plus phosphorylée sur la Sérine 2, le passage d'un répresseur transcriptionnel à activateur transcriptionnel à travers le changement du recrutement de corépresseur à coactivateur ne peut plus se réaliser. En effet, nous n'observons plus de recrutement du coactivateur P300 sur le promoteur d'IL2 (Figure 8G) et nous supposons que la fixation de MTA1 ne diminuera pas en présence de l'inhibiteur de la PKC (Figure 8F en cours).

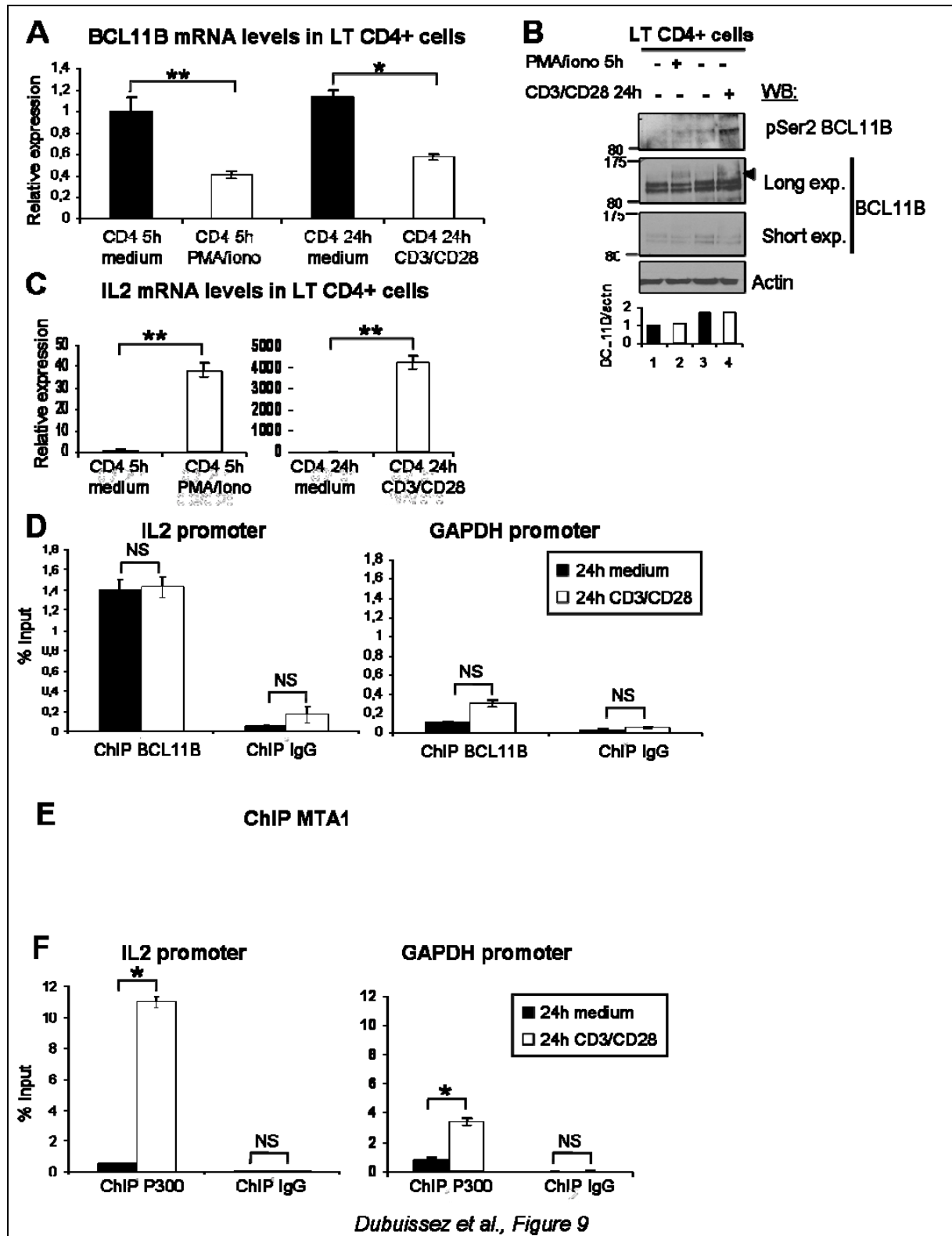


Figure 9 :

Nous allons reproduire le ChIP MTA1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés ou non afin d'obtenir une fixation significative de MTA1 sur le promoteur d'IL2 par rapport au promoteur de la GAPDH. Nous réaliserons également le même type d'expériences en présence d'un inhibiteur de PKC afin de conforter notre modèle.

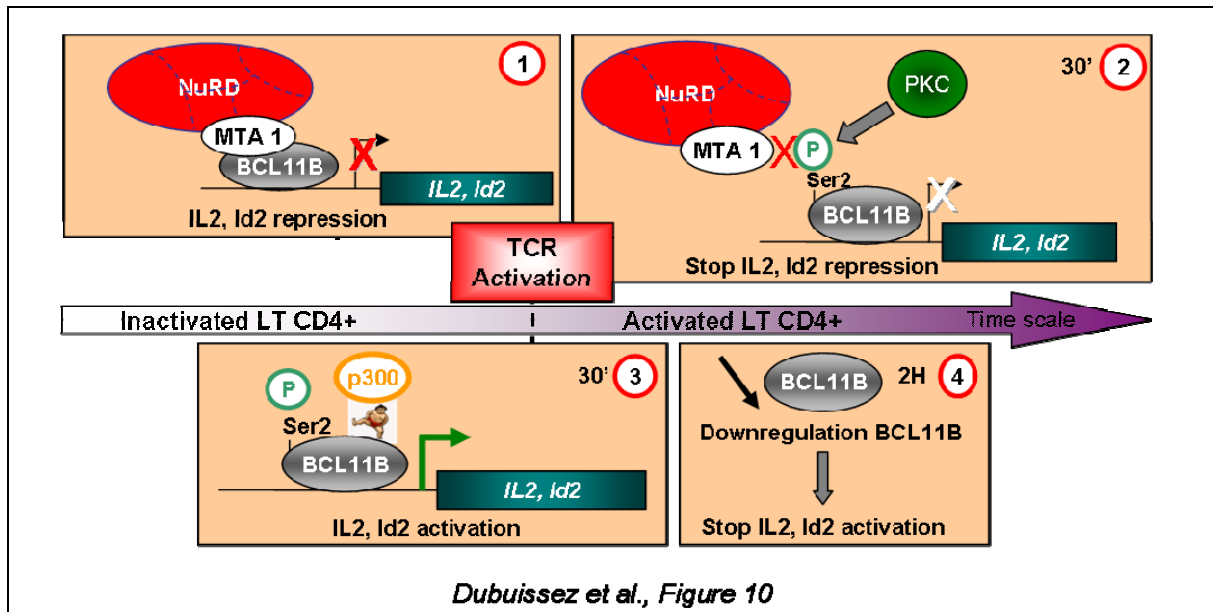
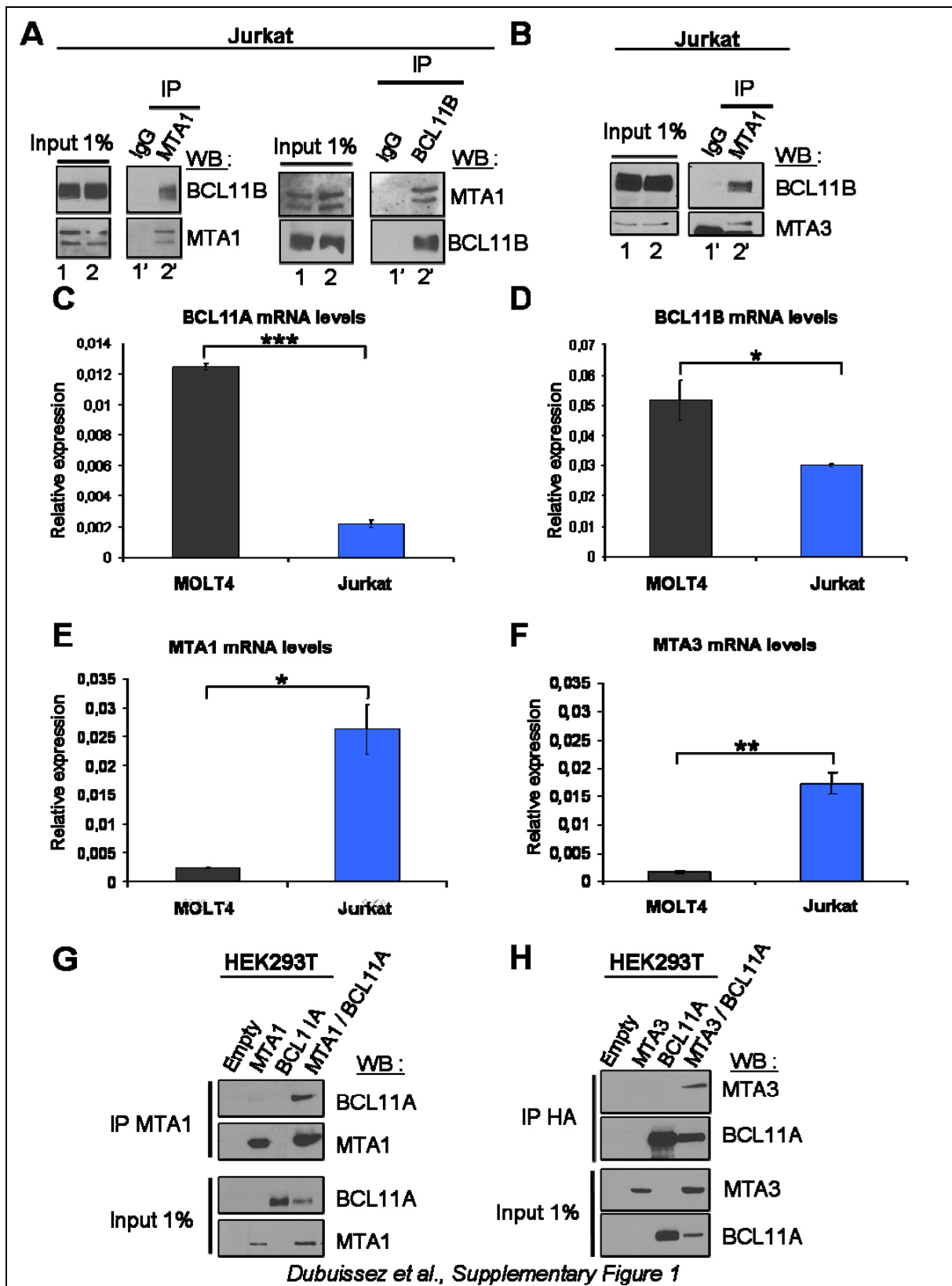
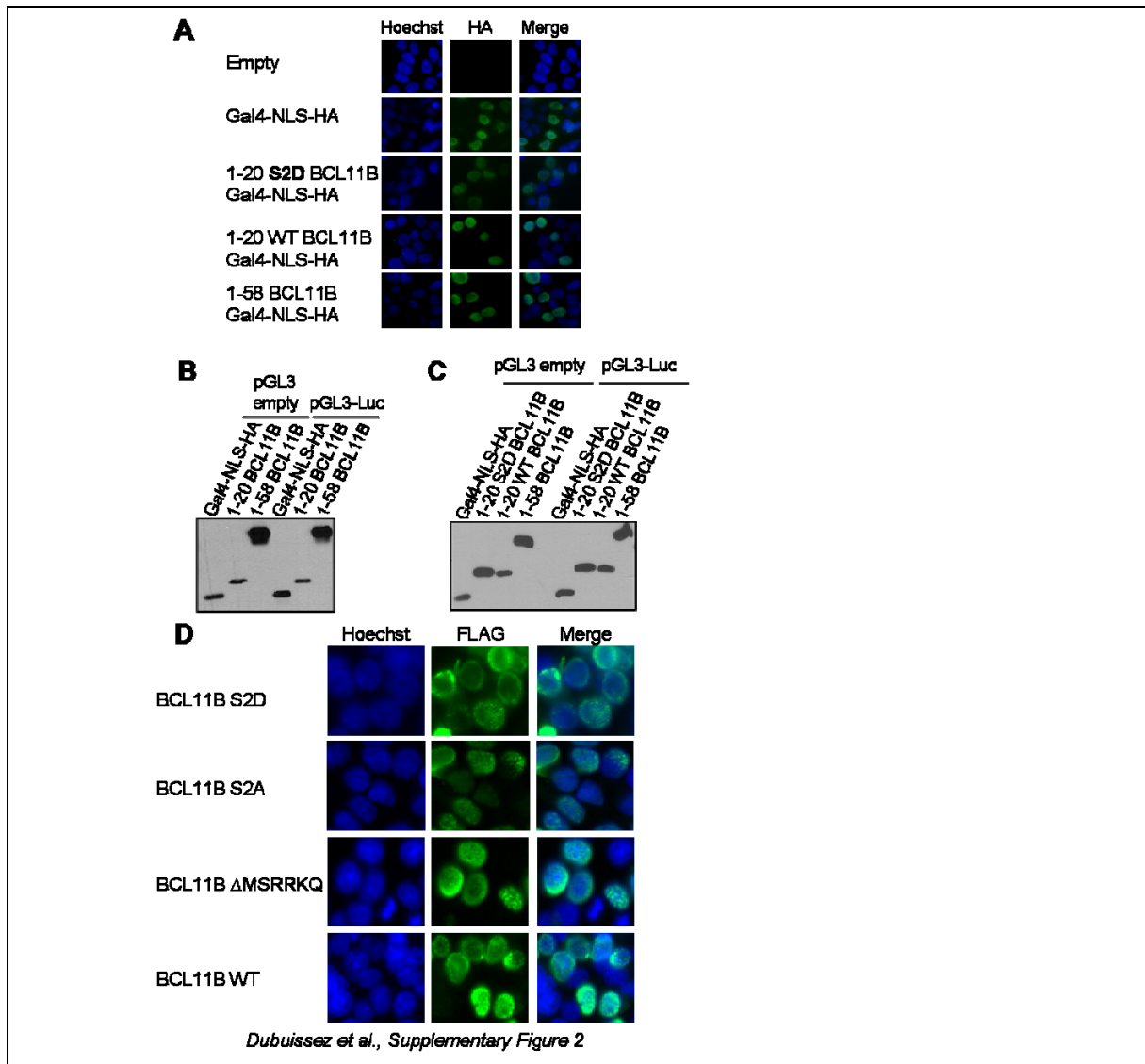
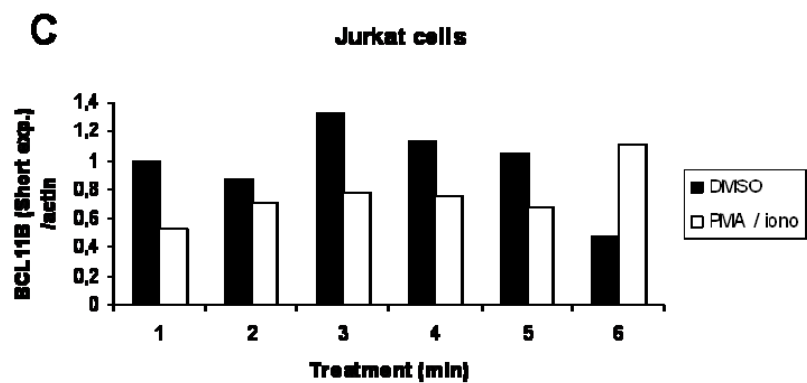
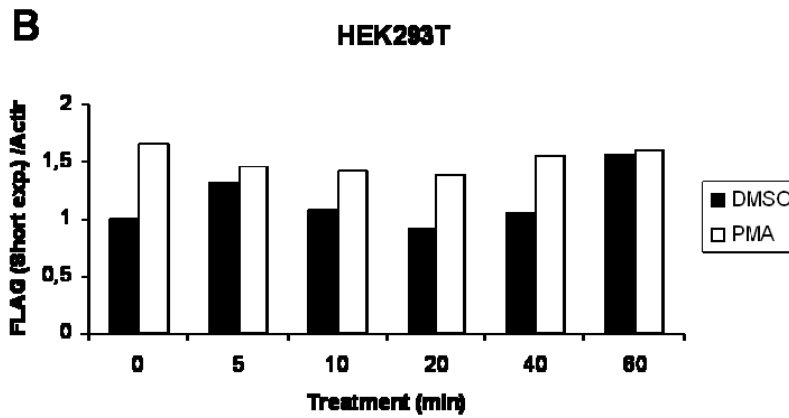
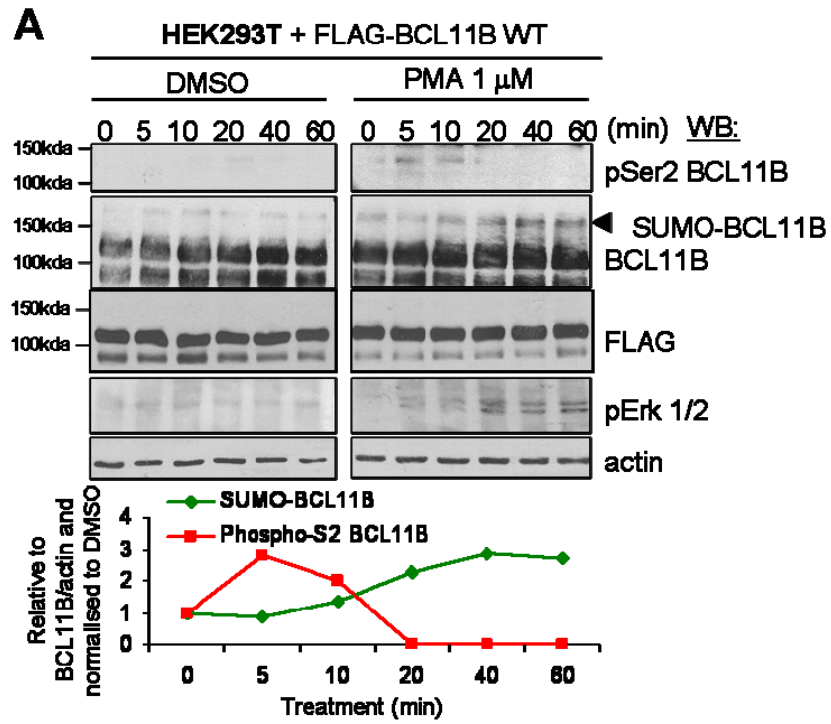


Figure 10 :

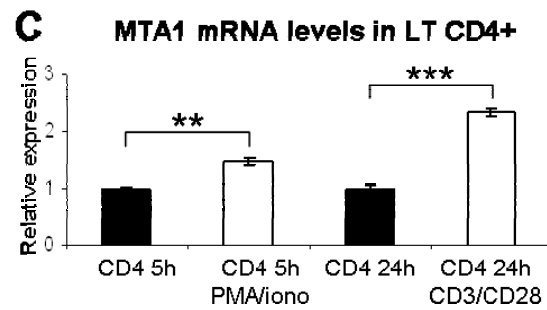
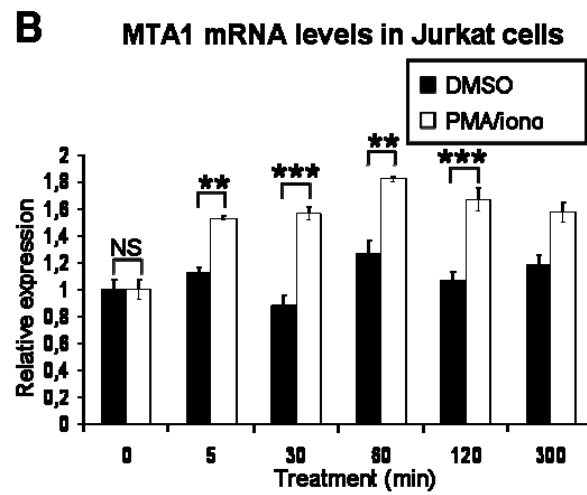
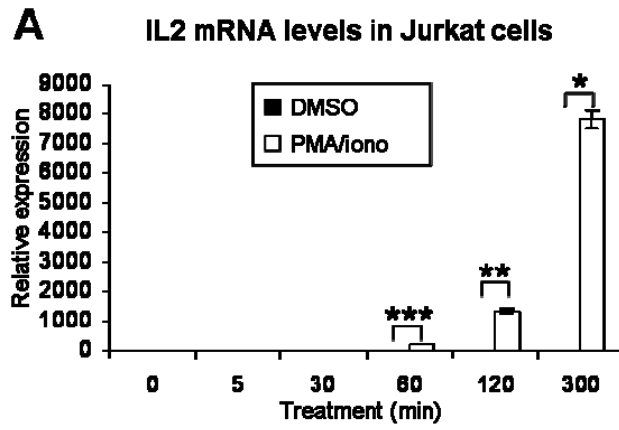
En fonction des nouveaux et prochains résultats, le schéma représentant notre modèle de régulation de BCL11B par des modifications post-traductionnelles au cours de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ humains sera mis à jour (cf Discussion Générale, Figure 53).



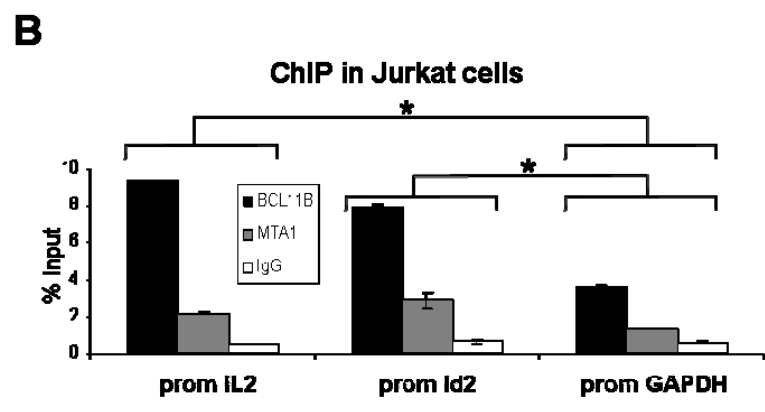
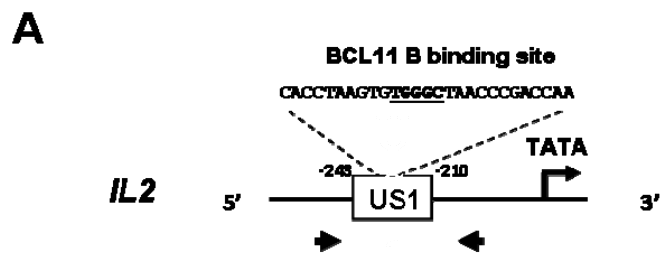




Dubuissez et al., Supplementary Figure 3



Dubuissez et al., Supplementary Figure 4



Dubuissez et al., Supplementary Figure 5

2 Publication n°2

La caractérisation de l'interaction entre les protéines HIC1 et BCL11 en lien avec le complexe NuRD

En cours de préparation pour Plos One

Marion Dubuissez, Capucine Van Rechem, Ingrid Loison, Han Vorng, Anne Tsicopoulos et Dominique Leprince

Les facteurs de transcription HIC1 et BCL11 recrutent le complexe NuRD grâce à une interaction avec les protéines MTA (cf Figure 36). Un crible double-hybride réalisé avec les régions BTB-RC de HIC1 comme appât, a permis d'isoler d'une part, l'extrémité C-terminale de MTA1 (Van Rechem et al., 2010) et d'autre part, la région C-terminale de BCL11A (Van Rechem, Thèse de Doctorat, Université de Lille 2009). De plus, le domaine C-terminal de BCL11A isolé lors de ce crible étant fortement conservé avec son paralogue BCL11B, HIC1 pourrait interagir également avec BCL11B. Puis, ces protéines interagissant toutes deux avec MTA1, nous avons voulu déterminer les modalités d'interactions entre les protéines HIC1, BCL11 et MTA1 (cf Figure 36). Deux hypothèses de travail contradictoires s'offrent à nous : 1) ces protéines forment-elles un complexe ternaire pour la régulation synergique de gènes cibles communs ? 2) HIC1 séquestre-t-il BCL11 dans des « HIC1 bodies » comme dans le cas de TCF4 et HIC1 ?

Cet article en préparation qui est la suite d'un travail débuté par C. Van Rechem, concerne l'étude de l'interaction entre les protéines HIC1 et BCL11 en lien avec le complexe NuRD.

the HIC1 protein. The different isoforms of BCL11A (XL and L) and the BCL11B paralog are schematically shown. The BCL11 Zinc fingers are shown as boxes and the two central zinc fingers involved in sequence-specific DNA-binding are highlighted in black. The four BCL11A isolated clones (Y2H prey) correspond to the C-terminal region (residues 652-818) of BCL11AXL whose amino-acid sequence is indicated and overlap with the three C-terminal Zinc fingers. Note that the last Histidine residue of the third C₂H₂ Zinc finger is not present in the isolated prey (lower-case letters underlined).

(B) *CLUSTAL alignments of the human BCL11A-XL and BCL11B C-terminal region.* The human BCL11-XL (Q9H165-1; 835 AA) and BCL11B (Q9C0K0-1; 894 AA) proteins were extracted from UniProtKB (www.uniprot.org) and aligned using CLUSTAL/Jalview (EMBL) and default parameters. The output file was subsequently edited manually to show only the C-terminal regions. In the consensus lane (Cons), identical residues are shown as *, conserved substitutions as : and semi-conserved substitutions as . under the aligned sequences. The three C₂H₂ Zinc fingers are highlighted as grey boxes whereas the SUMOylation sites of BCL11A {Kuwata, 2008 #41} and of BCL11B {Zhang, #40} are underlined with the target lysine in bold. The BCL11A sequence isolated in the Y2H screen is shown as a dotted yellow line between the two sequences.

HIC1 interagit avec BCL11A-XL

Un crible double-hybride en levure a été réalisé avec comme appât les domaines de répression transcriptionnelle de HIC1, les régions BTB et RC pour identifier les partenaires potentiels de HIC1. Ce crible a déjà permis d'isoler MTA1 (Van Rechem et al., 2010), ARID1A (Van Rechem et al., 2009b) et PHF1 (Boulay et al., 2011). Il a également permis d'isoler la région C-terminale de BCL11A-XL comprise entre les acides aminés 652 et 818. Cette région de BCL11A-XL inclut les trois doigts de zinc (ZFs) C-terminaux bien que le troisième ZF soit tronqué (Figure 1A).

Pour valider l'interaction entre HIC1 et BCL11A-XL, nous avons d'abord effectué des expériences de co-immunoprécipitation (Co-IP) après transfection transitoire des protéines dans des cellules HEK293T. Nous observons que les protéines BCL11A-XL co-immunoprécipitent avec les protéines HIC1 confirmant ainsi leur interaction (Figure 2A, ligne 4). De plus, le locus de BCL11A code, entre autres, deux isoformes après épissage alternatif : l'isoforme extra longue BCL11A-XL et l'isoforme longue BCL11A-L qui diffèrent au niveau de leur région C-terminale. En effet, le variant BCL11A-L ne possède pas les trois ZFs C-terminaux présents dans BCL11A-XL qui est la région isolée en crible double-hybride (Figure 1A). Nous avons donc étudié l'interaction HIC1 avec BCL11A-L et BCL11A-XL par une expérience de Co-IP. Nous montrons que seule l'isoforme longue BCL11A-XL co-immunoprécipite avec HIC1 (Figure 2B, lignes 5 et 6). Ce résultat valide le crible double-hybride, l'isoforme longue de BCL11A, BCL11A-XL interagissant avec HIC1 et de plus, suggère que les ZFs C-terminaux sont le seul domaine d'interaction avec HIC1. Chez la souris, BCL11A est exprimée principalement au niveau du système nerveux central et dans la lignée érythroïde (Leid et al., 2004; Sankaran et al., 2008). Des expériences de RT-qPCR pour quantifier l'expression de HIC1 et de BCL11A montrent que les fibroblastes BJ qui sont notre modèle d'étude pour HIC1, n'expriment pas BCL11A contrairement aux cellules Daoy, une lignée de médulloblastome qui expriment BCL11A à un taux élevé et HIC1 à un taux détectable comparé aux cellules BJ (Pinte et al., 2004b) (Figure 2C-D). Nous avons donc réalisé une expérience de Co-IP entre les protéines endogènes dans une

fraction chromatinienne solubilisée de cellules Daoy. Nous observons que BCL11A co-immunoprécipite avec HIC1 validant donc cette interaction entre les protéines endogènes (Figure 2E, ligne 2’).

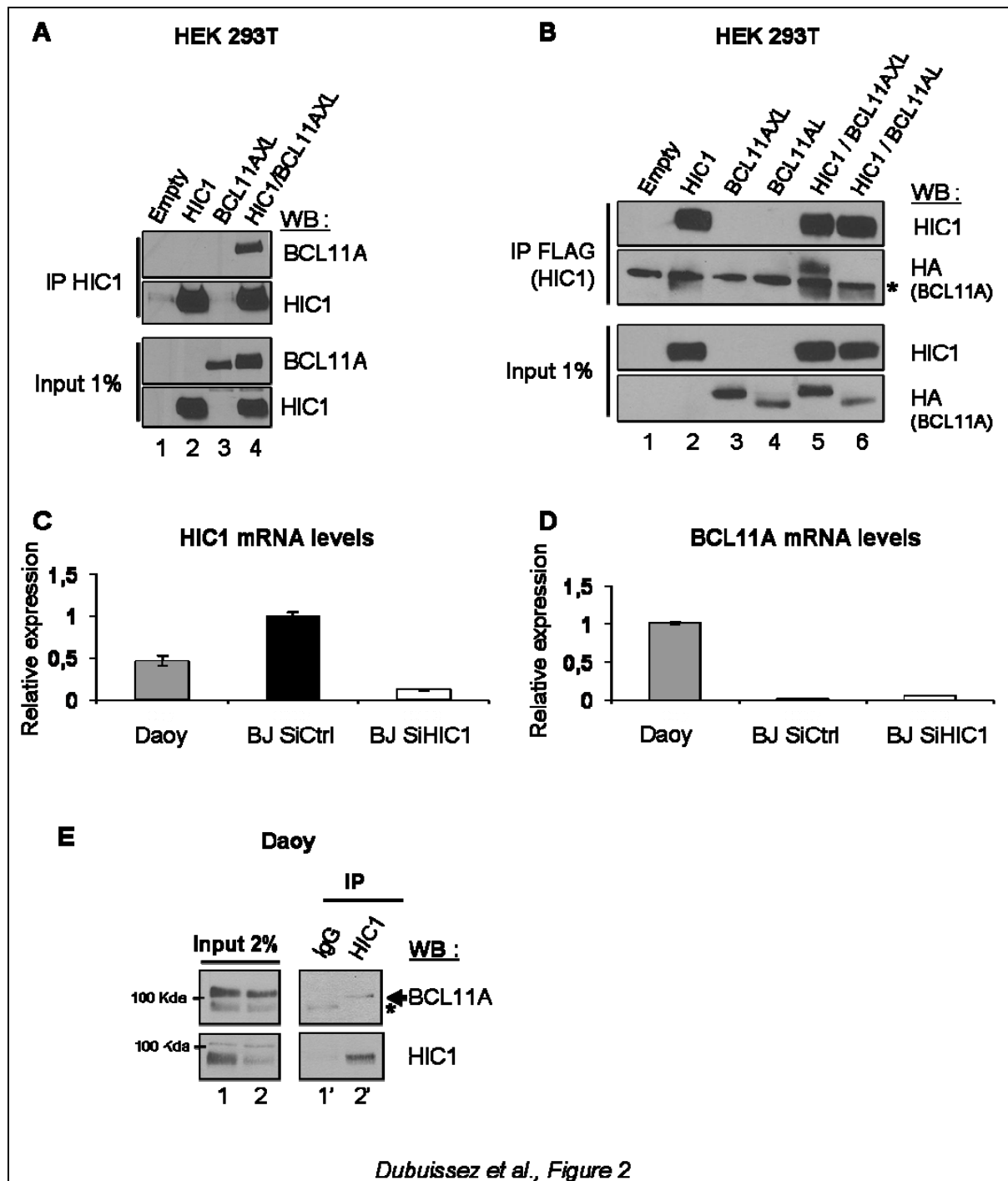


Figure 2. HIC1 interacts with BCL11A-XL.

(A) *HIC1* interacts with *BCL11A-XL*. HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated plasmids and the empty pcDNA3-FLAG vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-HIC1 antibodies (Top panels, IP HIC1, lanes 1 to 4) and immunoblotted with polyclonal

antibodies against BCL11A to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-HIC1 antibodies to verify the presence of HIC1 proteins. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Lower panels, INPUT). (B) *HIC1 interacts with BCL11A-XL but not with BCL11A-L*. A similar experiment was realized in HEK293T transfected with the HA-BCL11A-XL, HA-BCL11A-L and FLAG-HIC1 expression vectors in relevant combinations. Whole cells lysates were immunoprecipitated with monoclonal anti-FLAG antibodies and treated as described above with anti-HA (for BCL11A) and anti-HIC1 antibodies. * corresponds to a non-specific band. (C, D) *HIC1 and BCL11A are co-expressed in the DAOY medulloblastoma cell line*. Total RNAs were extracted from DAOY medulloblastoma cells or from BJ-TERT human fibroblasts (expressing endogenous *HIC1*) transfected with nontarget siRNA control (siCtrl) or with a pool of siRNAs targeting HIC1 (siHIC1) (Dehennaut et al., 2013b). RT-qPCR experiments were performed to assess the levels of *HIC1* (C) and *BCL11A* (D) mRNAs. Values were normalized to *18S*. (E) *Co-immunoprecipitation of endogenous nuclear BCL11A proteins by HIC1 in Daoy medulloblastoma cells*. Daoy cells were lysed with IPH buffer and micrococcal nuclease solubilized chromatin fractions were prepared in duplicate from the same number of cells. 2% of each fraction was retained for direct analyses by Western blot (Input, lanes 1 and 2) and the interaction between BCL11A and HIC1 was evaluated by co-immunoprecipitation with an anti HIC1 monoclonal antibody (lane 1') and normal rabbit IgG used as control (2') followed by Western blot with anti BCL11A antibodies. The membranes were striped and blotted with polyclonal anti HIC1 antibodies. * corresponds to a non-specific band.

HIC1 interagit également avec BCLL1B, l'homologue de BCL11A

BCL11A possède un paralogue, BCL11B qui présente 61% d'homologie de séquence protéique et 95% au niveau des ZFs avec BCL11A chez l'homme (Satterwhite et al., 2001) (Figure 1B). Chez la souris, au cours du développement embryonnaire, BCL11B est exprimée préférentiellement au niveau du thymus de même que HIC1 (Grimm et al., 1999; Leid et al., 2004). De plus, la région C-terminale de BCL11A-XL isolée en crible double-hybride est très similaire à la région C-terminale de BCL11B (Figure 1B). Nous nous sommes donc demandés si HIC1 pouvait interagir avec BCL11B. Par une expérience de Co-IP après surexpression des protéines en HEK293T, nous montrons que BCL11B interagit avec HIC1 (Figure 3A, ligne 4). Par des expériences de RT-qPCR, nous observons que les fibroblastes BJ n'expriment pas de BCL11B contrairement à la lignée de cellules Jurkat. En revanche, les cellules Jurkat n'expriment pas HIC1, seule la lignée de cellules T CD4⁺, HH exprime HIC1 à un faible niveau par rapport aux cellules BJ (Figure 3B-C). Par la suite, nous avons pu valider l'interaction entre les protéines endogènes par une expérience de Co-IP dans les cellules HH. Nous montrons que dans la fraction chromatinienne, BCL11B co-immunoprécipite avec HIC1 (Figure 3D, ligne 2'). Ce résultat valide donc l'interaction entre les protéines endogènes HIC1 et BCL11B.

Nous avons décidé de focaliser notre étude sur l'interaction entre HIC1 et BCL11B à cause de l'intérêt et grâce à la disponibilité de modèles cellulaires lymphoïdes.

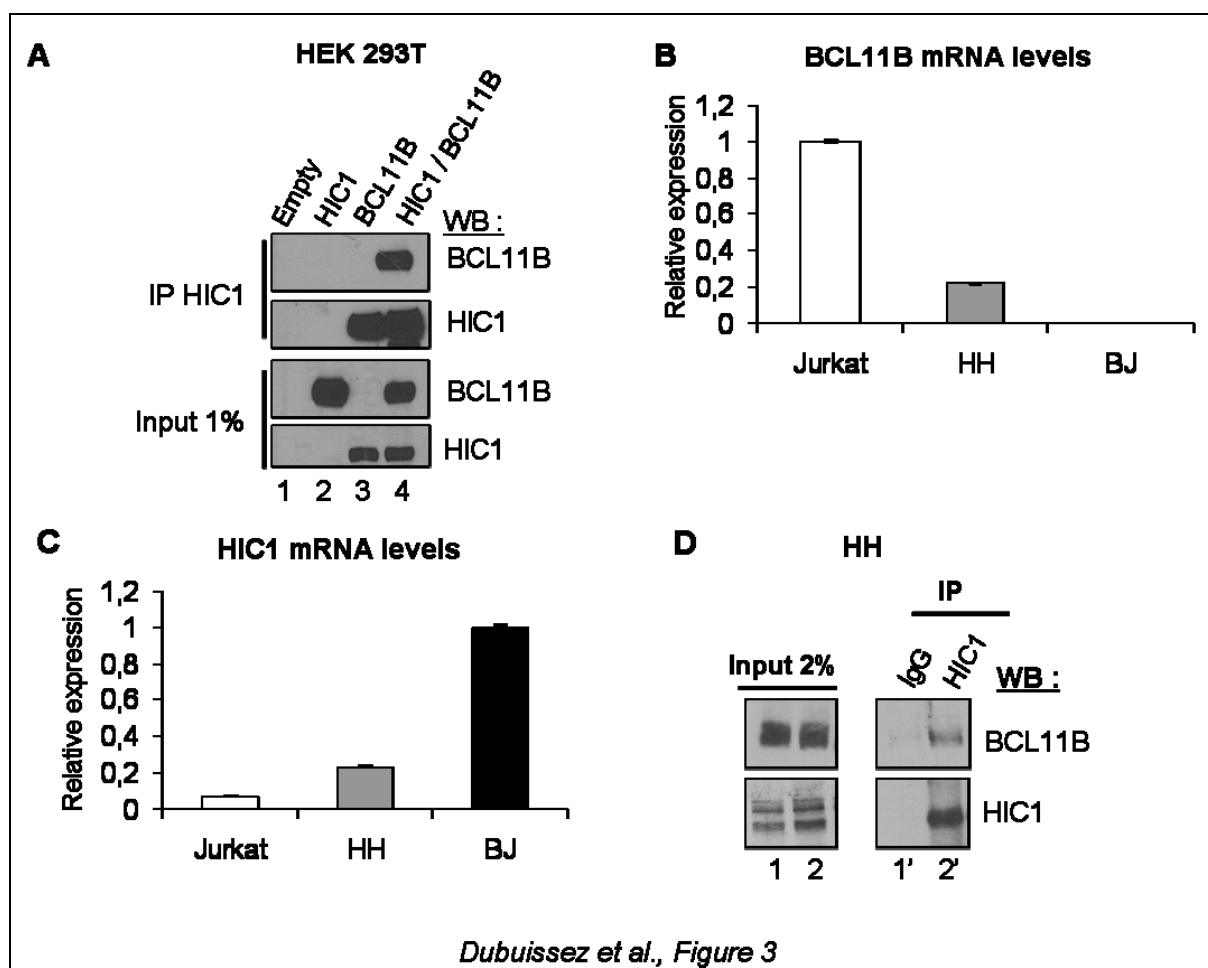


Figure 3. HIC1 interacts with BCL11B.

(A) *HIC1* interacts with *BCL11B*. HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated plasmids and the empty pcDNA3-FLAG vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-HIC1 antibodies (Top panels, IP HIC1, lanes 1 to 4) and immunoblotted with polyclonal antibodies against BCL11B to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-HIC1 antibodies to verify the presence of HIC1 proteins. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Lower panels, INPUT). (B, C) *HIC1* and *BCL11B* are co-expressed in the HH lymphoid cell line. Total RNAs were extracted from the HH and Jurkat lymphoid cells or from BJ-TERT human fibroblasts (expressing endogenous *HIC1*) as control. RT-qPCR experiments were performed to assess the levels of *BCL11B* (B) and *HIC1* (C) mRNAs. Values were normalized to 18S. (D) *In vivo*, *HIC1* and *BCL11B* interact in the HH lymphoid cell line. HH cells were lysed with IPH buffer and micrococcal nuclease solubilized chromatin fractions were prepared in duplicate from the same number of cells. 1% of each fraction was retained for direct analyses by Western blot (Input, lanes 1 and 2) and the interaction between BCL11B and HIC1 was evaluated by co-immunoprecipitation with an anti HIC1 monoclonal antibody (lane 1') and normal rabbit IgG used as control (2') followed by Western blot with anti BCL11B antibodies. The membranes were striped and blotted with polyclonal anti HIC1 antibodies.

Domaines de HIC1 impliqués dans l'interaction avec BCL11B

Pour déterminer quelles régions de HIC1 sont essentielles pour l'interaction avec BCL11B, nous avons utilisé deux constructions de HIC1 : une comprenant uniquement le domaine de répression transcriptionnelle BTB/POZ et une incluant les cinq ZFs C-terminaux (Figure 4A). La région centrale (RC) de HIC1 isolée étant mal structurée lorsque le domaine BTB/POZ en N-terminal et le domaine de liaison à l'ADN en C-terminal sont absents (Deltour et al., 2002), nous n'avons pu déterminer son interaction avec BCL11B. Par contre dans des expériences de Co-IP après transfection transitoire en HEK293T, ces deux domaines isolés de HIC1 co-immunoprécipitent avec BCL11B (Figure 4B, ligne 4 et Figure 5C, ligne 4). Ces résultats montrent que plusieurs domaines de HIC1 sont impliqués dans l'interaction avec BCL11B. De plus, les cinq ZFs de HIC1 interagissant avec BCL11B, nous nous sommes demandé si la fixation de HIC1 à l'ADN était nécessaire à cette interaction. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de Co-IP avec une protéine HIC1 mutée au niveau du 3^{ème} ZF, HIC1 C521S, qui n'est plus capable de se fixer à l'ADN (Figure A) (Pinte et al., 2004b). La mutation C521S détruit la structure du ZF3 qui est directement impliqué dans la reconnaissance du motif GCA au cœur du site de fixation à l'ADN de HIC1 (cf 5.5). Nous observons que le mutant HIC1 C521S interagit avec BCL11B même si l'interaction semble plus faible qu'avec HIC1 WT (Figure 4D, lignes 5 et 6). Donc, la fixation à l'ADN de HIC1 ne serait pas indispensable pour l'interaction avec BCL11B mais, cette interaction mettrait en jeu les propriétés d'interaction protéine-protéine des doigts de zinc.

Ensuite, HIC1 interagissant également avec MTA1, nous avons déterminé si l'interaction avec BCL11B pouvait dépendre de MTA1. Dans un premier temps, nous avons utilisé un des mutants de HIC1 n'interagissant plus avec MTA1, HIC1 K314Q (Van Rechem et al., 2010). Nous montrons que les protéines BCL11B ne co-immunoprécipitent pas de manière significative avec HIC1 K314Q (Figure 4E, ligne 6). Dans un second temps, la SUMOylation de HIC1 induite par des dommages à l'ADN non réparables favorisant l'interaction avec MTA1 (Publication n°5)(Dehennaut et al.,

2013b), nous avons déterminé si elle pouvait influencer l'interaction avec BCL11B. Par une expérience de Co-IP après surexpression des protéines et traitement de 16h à l'étoposide afin d'induire la SUMOylation de HIC1 qui favorise l'interaction avec MTA1, nous observons une augmentation de l'interaction HIC1-BCL11B (Figure 4F, lignes 7 et 8). Ces résultats suggèrent que l'interaction entre HIC1 et BCL11B serait très complexe et pourrait dépendre en partie de l'interaction avec MTA1.

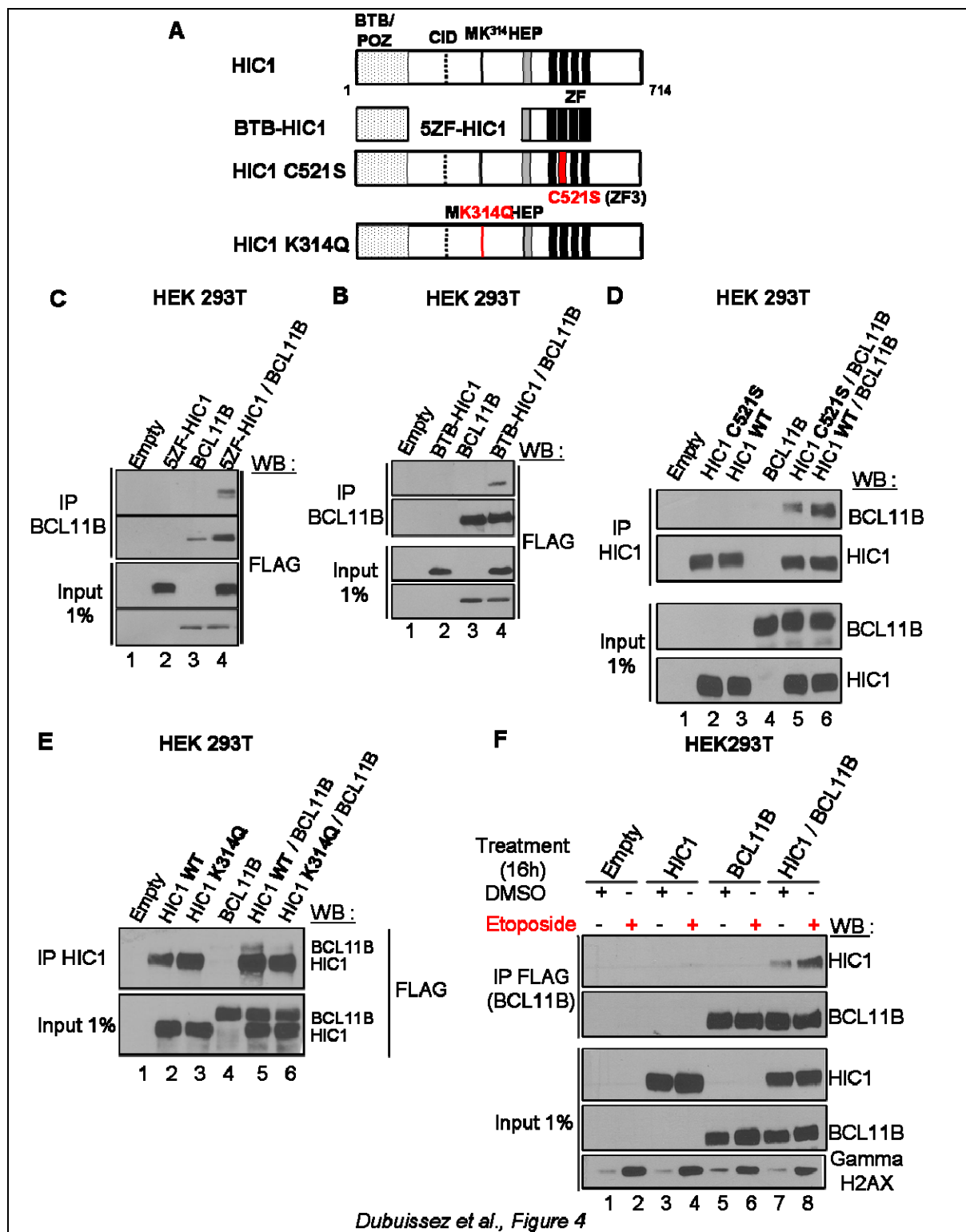


Figure 4. The BTB/POZ and Zinc Finger domains of HIC1 interact with BCL11B

A) Schematic drawing of full-length HIC1 proteins and of the isolated BTB/POZ and 5 C₂H₂ Zinc fingers domains and of the HIC1 K314Q and HIC1 C521S point mutants. The HIC1 K314Q point mutant unable to interact with MTA1 (Van Rechem et al., 2010) and the HIC1 C521S point mutant (Pinte et al., 2004b) which is inhibited in its sequence specific-DNA binding properties are also indicated. (B) The isolated BTB/POZ domain of HIC1 interacts with BCL11B. HEK293T cells were transiently

transfected with the pcDNA3-FLAG-BTB-HIC1 and with the pcDNA3-FLAG-BCL11B expression plasmids as indicated as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control for 48h. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-BCL11B antibodies (Top panels: IP BCL11B, lanes 1-4). Relevant pieces of the membrane were immunoblotted (WB) with anti-FLAG monoclonal antibodies to detect BTB-HIC1 co-immunoprecipitation and to verify the presence of BCL11B in the immunoprecipitates. 1% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against FLAG to ascertain the presence of BTB-HIC1 and BCL11B (Bottom panel: Input, lanes 1-4). C) *The C-terminal 5 C₂H₂ Zinc fingers domain of HIC1 interacts with BCL11B.* The same experiment than in panel B) but with the pcDNA3-FLAG-5ZF-HIC1 and wt BCL11B expression vectors. D) *The C521S point mutation in the HIC1 Zinc finger 3 slightly inhibits the interaction with BCL11B.* Co-immunoprecipitation experiments using anti HIC1 antibodies followed by Western blot analyses were conducted in HEK293T as described above but with pcDNA3-FLAG expression vectors for wt BCL11B, wt HIC1 and HIC1 C521S point mutant as indicated. E) *The K314Q HIC1 point mutant deficient for interaction with MTA1 did not interact with BCL11B.* Co-immunoprecipitation analyses with lysates of HEK293T cells transfected with the indicated combination of expression vectors using anti HIC1 antibodies followed by Western blot analyses with anti FLAG antibodies. F) *The SUMOylation of HIC1 which promotes interaction with MTA1, also favors interaction with BCL11B.* HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated combination of pTL-HIC1 and pcDNA3-FLAG-BCL11B expression vectors and the empty pcDNA3-FLAG vector used as a control and were treated with Etoposide or DMSO treatment during 16h. Whole cell extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-FLAG antibodies (Top panels, IP FLAG, lanes 1 to 8) and immunoblotted with anti-HIC1 antibodies to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-FLAG antibodies to verify the presence of BCL11B. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (INPUT).

HIC1 et BCL11B interagissent avec deux régions différentes de MTA1

Les protéines HIC1 et BCL11B sont toutes deux capables d'interagir avec l'extrémité C-terminale de MTA1 pour recruter le complexe NuRD. D'une part, HIC1 interagit avec MTA1 via un motif de séquence peptidique MKHEP localisé dans sa région centrale (Van Rechem et al., 2010; Stankovic-Valentin et al., 2007). D'autre part, BCL11B interagit avec MTA1 via un motif N-terminal conservé, MSRRKQ (Lin et al., 2004) (Publication n°1). Dans le cas de FOG1 qui possède ce même motif N-terminal, la zone d'interaction entre le motif N-terminal et RbAp48 est enfouie au cœur de la structure de RbAp48 ce qui exclut la possibilité qu'une même protéine FOG1 interagisse à la fois avec MTA1 et RbAp48 (Lejon et al., 2011). Afin de s'assurer que BCL11B puisse interagir avec HIC1 et MTA1, nous avons tout d'abord vérifié que l'interaction entre HIC1 et BCL11B n'impliquait pas la région N-terminale de BCL11B. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de Co-IP entre les constructions N-terminales de BCL11B, 1-20 et 1-58 BCL11B et HIC1 (Supp. Figure 1A-B). Nous n'observons pas d'interaction significative entre les fragments 1-20 et 1-58 BCL11B et HIC1 indiquant que le motif N-terminal de BCL11B essentiel pour l'interaction avec MTA1, n'est pas impliqué dans l'interaction avec HIC1 (cf Publication n°1). Puis, afin de déterminer si les protéines HIC1 et BCL11B entrent en compétition pour interagir avec MTA1, nous avons réalisé une expérience de Co-IP entre HIC1 et MTA1 en présence d'un excès de la construction 1-58 BCL11B après surexpression des protéines en HEK293T. Nous observons que MTA1 co-immunoprécipite autant avec HIC1 en présence ou non de l'excès de 1-58 BCL11B (Figure 5B, lignes 4' et 5'). Ce résultat indique que l'excès du fragment 1-58 BCL11B n'influence pas l'interaction entre HIC1 et MTA1. Réciproquement, l'interaction entre le fragment 1-58 BCL11B et les protéines MTA1 endogènes n'est pas influencée en présence ou non de HIC1 (Supp. Figure 1C, lignes 3' et 4'). Ces résultats suggèrent que les protéines HIC1 et BCL11B pourraient interagir avec les mêmes protéines MTA1 pour former un complexe ternaire HIC1-BCL11B-MTA1. De même que HIC1 et BCL11B ne seraient pas en compétition pour interagir avec l'extrémité C-terminale de MTA1 contrairement aux protéines FOG2 et RbAp48 qui interagissent avec

la même région de MTA1 ce qui implique qu'au moins 2 protéines FOG2 différentes sont nécessaires pour interagir avec 1 seul complexe NuRD. Ensuite, nous avons étudié l'interaction entre HIC1 et des mutants de BCL11B, BCL11B S2D et BCL11B Δ MSRRKQ, qui n'interagissent plus avec MTA1 (Figure 5A) (cf Publication n°1). Par des expériences de Co-IP en HEK293T, nous observons que les mutants BCL11B S2D et BCL11B Δ MSRRKQ co-immunoprécipitent mieux avec HIC1 (Figure 5C-D, lignes 5 et 6). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'interaction BCL11B-MTA1 favorise l'interaction HIC1-BCL11B.

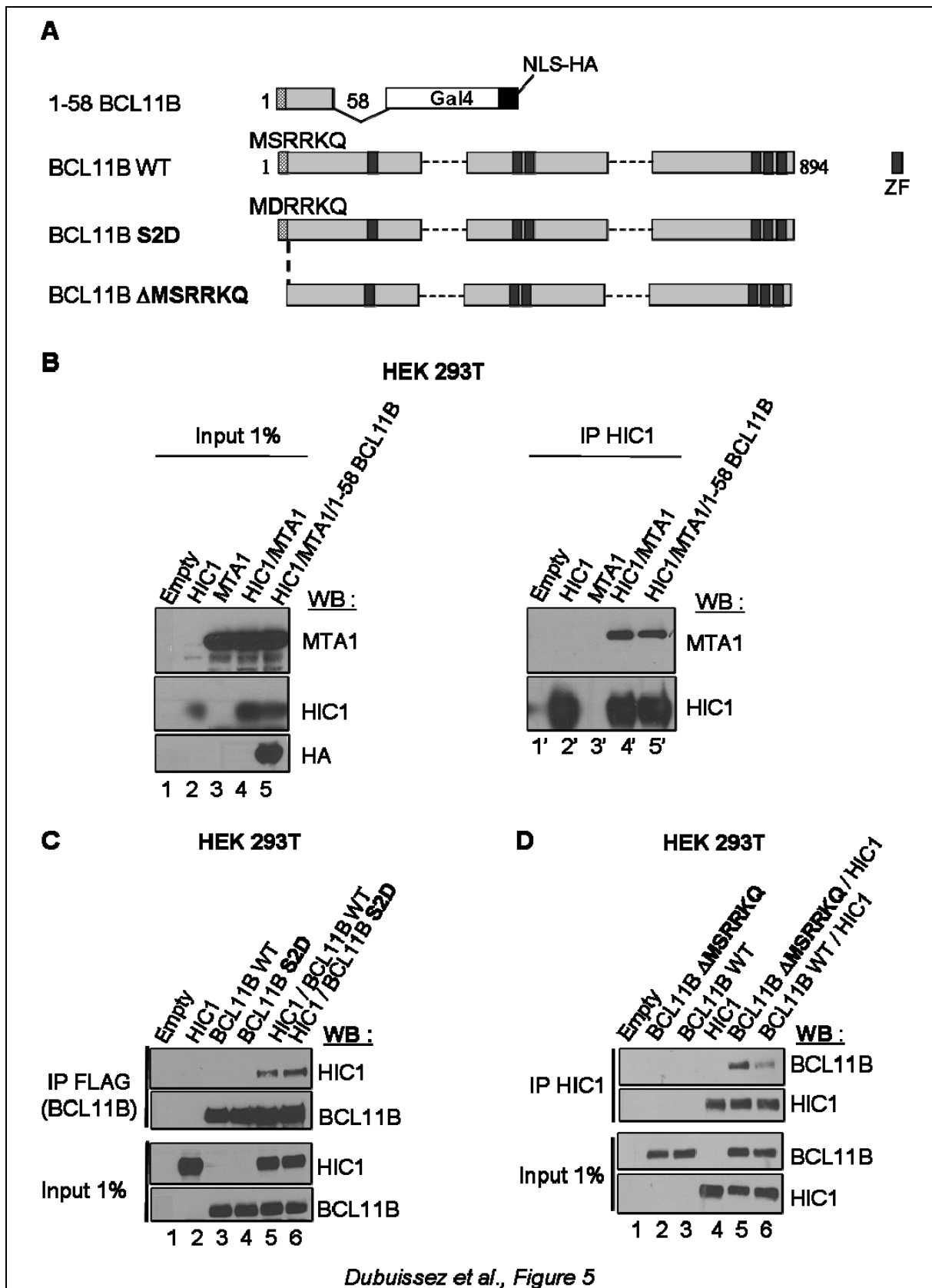


Figure 5. The BCL11B N-terminal repression motif, MSRRKQ, interacting with MTA1 does not compete for the HIC1-MTA1 interaction and its inactivation (S2D point mutant) or total deletion favours the interaction of BCL11B with HIC1.

(A) Schematic representation of the 1-58 BCL11B N-terminal fragment cloned in frame with the Gal4 binding domain, a Nuclear localization signal (NLS) and an epitope tag (HA) in the Gal4-NLS-HA vector and of full-length BCL11B proteins as well as the phosphomimetic (S2D) point or deletion (Δ MSRRKQ) mutants thereof. (B) An excess of the BCL11B 1-58 N-terminal MTA1-interacting domain does not affect the interaction of HIC1 with MTA1. HEK293T were transfected for 48h with the indicated expression vectors. Then, whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-HIC1 antibodies (Right panels, IP HIC1) and the immunoprecipitated material was immunoblotted with the anti-MTA1 antibodies to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti-HIC1 antibodies to ascertain the presence of HIC1 proteins in the immunoprecipitates. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Left panels, INPUT). (C) The interaction with HIC1 is slightly increased by the S2D phosphomimetic mutation of BCL11B. HEK293T were transiently transfected for 48h with the indicated combination of pTL-HIC1 and pcDNA3-FLAG-BCL11B expression vectors and the empty pcDNA3-FLAG vector used as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-FLAG antibodies (Top panel, IP FLAG, lanes 1 to 6) and immunoblotted with anti-HIC1 antibodies to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then re-probed with anti FLAG monoclonal antibodies to verify the presence of BCL11B. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (INPUT). (D) The interaction of BCL11B with HIC1 is favoured by the deletion of the MSRRKQ MTA1-interaction motif of BCL11B. A similar experiment was realized in HEK293T but with HIC1, BCL11B and the FLAG- Δ MSRRKQ BCL11B deletion mutant.

Le complexe ternaire HIC1-BCL11B-MTA1 est-il envisageable ?

Pour avoir la formation d'un complexe ternaire, il faut que les interactions binaires soient possibles et stables et/ou que ces interactions soient stabilisées lorsque les trois partenaires protéiques sont exprimés. Nous avons donc étudié les interactions deux à deux en présence ou non du troisième partenaire. Nous avons d'abord étudié l'interaction HIC1-BCL11B en présence d'une quantité croissante de MTA1 surexprimée par une expérience de Co-IP après transfection transitoire en HEK293T. Les protéines HIC1 co-immunoprécipitent avec BCL11B de même que les protéines MTA1 endogènes (Figure 6A, ligne 4). Puis, en présence d'une quantité croissante de protéines MTA1 surexprimées, l'interaction HIC1-BCL11B est déplacée en faveur de l'interaction BCL11B-MTA1 (Figure 6A, lignes 5-7). Cependant, une interaction entre HIC1 et BCL11B est encore possible même en présence d'un excès de MTA1 (Figure 6A, ligne 7). De la même façon, nous avons étudié l'interaction HIC1-MTA1 en présence ou non de BCL11B. Nous observons que l'interaction HIC1-MTA1 est déplacée en faveur de l'interaction BCL11B-MTA1 (Figure 6B, lignes 4 et 6). Ces résultats suggèrent que l'interaction BCL11B-MTA1 prédomine sur les interactions HIC1-BCL11B et HIC1-MTA1. Enfin, en ce qui concerne l'interaction BCL11B-MTA1 en présence ou non de HIC1, nous montrons que l'interaction BCL11B-MTA1 n'est pas influencée par la présence de HIC1 (Figure 6C, lignes 4 et 6). De plus, nous détectons également une faible interaction entre BCL11B et HIC1 (Figure 6C, ligne 6). Les mêmes expériences ont été réalisées avec BCL11A-XL et suggèrent également que l'interaction BCL11A XL-MTA1 prédomine sur les interactions HIC1-BCL11A XL et HIC1-MTA1 (Supp. Figure 2).

En résumé, ces résultats ne sont pas en faveur de la formation d'un complexe ternaire HIC1-BCL11B-MTA1. Cependant, afin de déterminer l'existence de ce complexe ternaire, nous utiliserons la technique d'immunoprécipitation séquentielle ou double Co-IP. Cette technique consiste en deux IP successives correspondant aux deux premières protéines et la révélation avec l'anticorps dirigé contre la troisième protéine. Dans notre cas, l'interaction HIC1-BCL11B n'est pas prédominante lorsque les

trois partenaires sont exprimés, notre 1^{ère} IP sera donc dirigée contre HIC1 par un anti-FLAG. Puis, nous éluerons les complexes protéiques précipités avec un peptide FLAG et effectuerons la deuxième IP avec un anticorps anti-BCL11B. Suite au SDS-PAGE, nous révélerons tout d'abord avec un anticorps anti-MTA1. Pour cela, nous réalisons actuellement une construction de BCL11B pleine longueur sans FLAG.

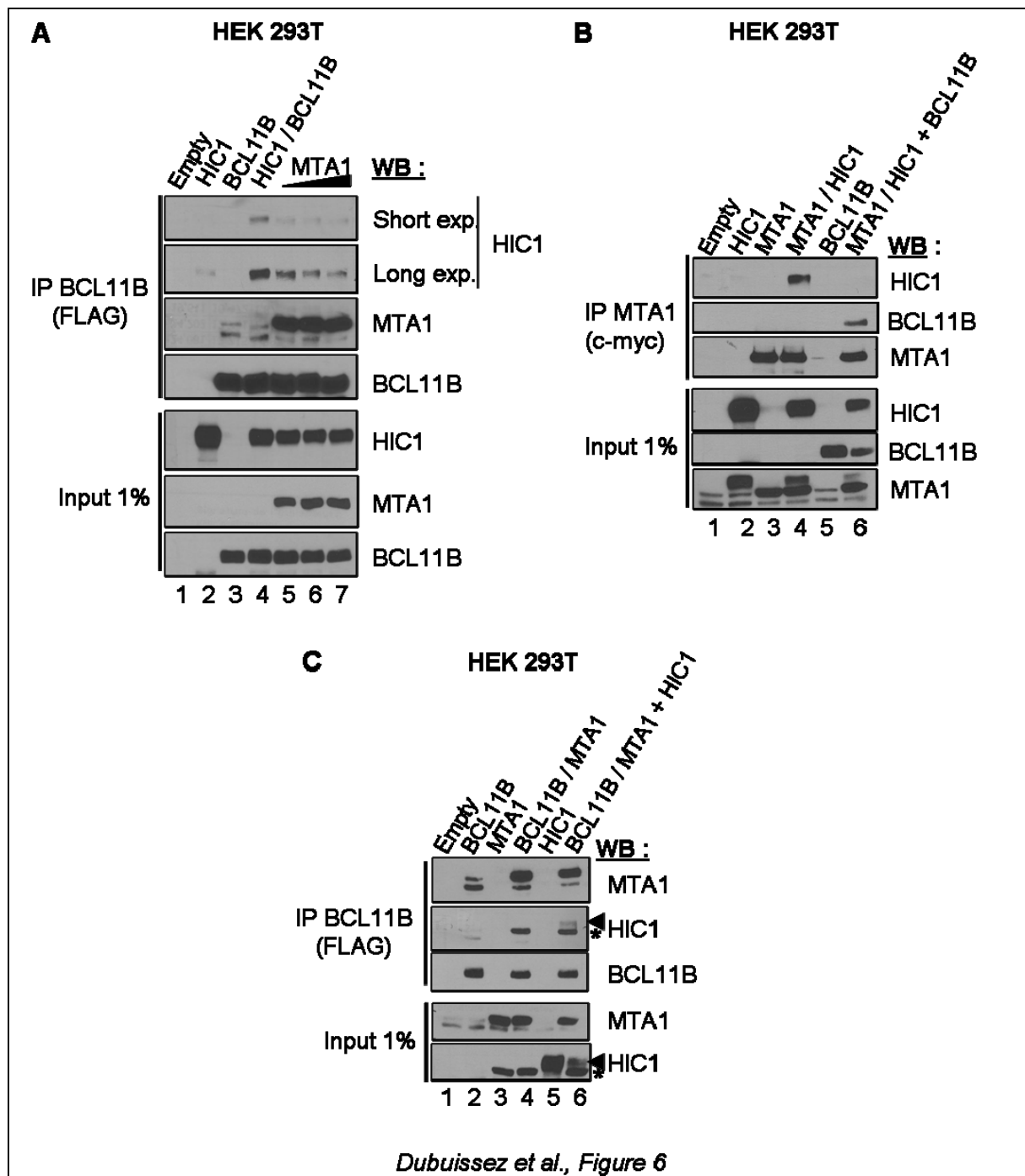


Figure 6. The HIC1-BCL11B and HIC1-MTA1 binary complexes are disrupted in presence of MTA1 and BCL11B, respectively whereas the BCL11B-MTA1 complex is not dissociated by addition of HIC1.

A) *The HIC1-BCL11B binary complex is rapidly disrupted by increasing amounts of MTA1.* HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combination of HIC1, MYC-MTA1 and of FLAG-BCL11B as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. In particular, HIC1 and BCL11B were co-transfected alone (lane 4) or in presence of an increasing gradient of MTA1 (lanes 5 to 7). Cells were lysed in IPH buffer, immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies and successively immunoblotted with anti-MYC (MTA1), anti-HIC1 and anti-FLAG (BCL11B) antibodies (INPUT, Bottom three Panels, lanes 1 to 7). B) *The HIC1-MTA1 complex is dissociated by the addition of BCL11B.* HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combination of HIC1, MYC-MTA1 and of FLAG-BCL11B as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. Total cell extracts prepared in IPH buffer were used in co-immunoprecipitation experiments followed by immunoblotting with the relevant antibodies as described in panel A) In particular, the formation of the HIC1-MTA1 binary complex was assessed in absence (lane 3) or in presence (lane 6) of co-transfected BCL11B. C) *The BCL11B-MTA1 complex is not dissociated by addition of HIC1.* A similar experiment was conducted for the BCL11B-MTA1 binary complex in absence (lane 3) or in presence of co-transfected HIC1 (lane 6).

L'interaction HIC1-BCL11B est indépendante de l'ADN

Une hypothèse alternative à celle d'un complexe ternaire entre deux répresseurs transcriptionnels (BCL11B et HIC1) et un corépresseur (MTA1) serait que HIC1 interagisse avec BCL11B pour le séquestrer dans des « HIC1 bodies » comme il a été décrit pour TCF4 (cf Figure 24) (Valenta et al., 2006). Nous avons tout d'abord déterminé si l'interaction HIC1-BCL11B était dépendante de l'ADN. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de Co-IP entre les protéines endogènes en présence de Bromure d'Ethidium (Et Br) dans les HH (Figure 7A). Cette technique est utilisée pour distinguer si une interaction est dépendante de l'ADN. Nous n'observons pas d'augmentation significative de l'interaction HIC1-BCL11B en présence de BET suggérant que cette interaction est indépendante de l'ADN (Figure 7A, lignes 2' et 3'). Pour conforter ce résultat, nous avons réalisé une Co-IP avec fractionnement cytoplasmique-nucléoplasmique (S) et chromatinien (P) selon le protocole expérimental décrit par Van Dessel et al. (Van Dessel et al., 2010). Nous observons que les protéines BCL11B sont plutôt localisées dans la fraction chromatinienne (P) que dans le cytoplasme/nucléoplasme (S) (Figure 7B, lignes 1 et 6). De plus, l'IP HIC1 étant similaire dans les deux fractions, nous observons que BCL11B co-immunoprécipite avec HIC1 dans la fraction S, en dehors de la chromatine (Figure 7B, lignes 3 et 5). Ce résultat suggère que les protéines HIC1 et BCL11B interagissent dans le nucléoplasme et conforte donc le fait que cette interaction soit indépendante de leur fixation à l'ADN.

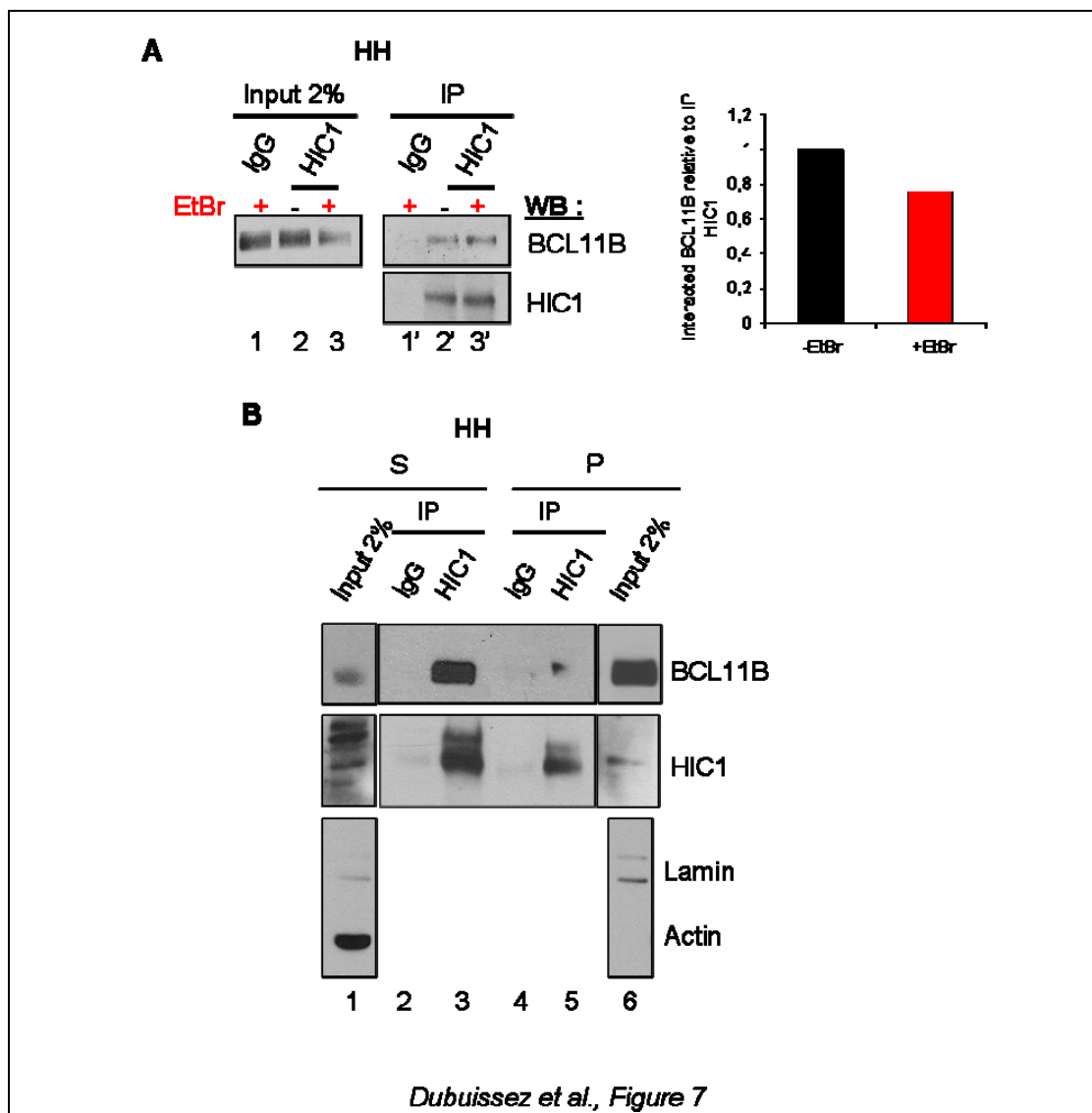
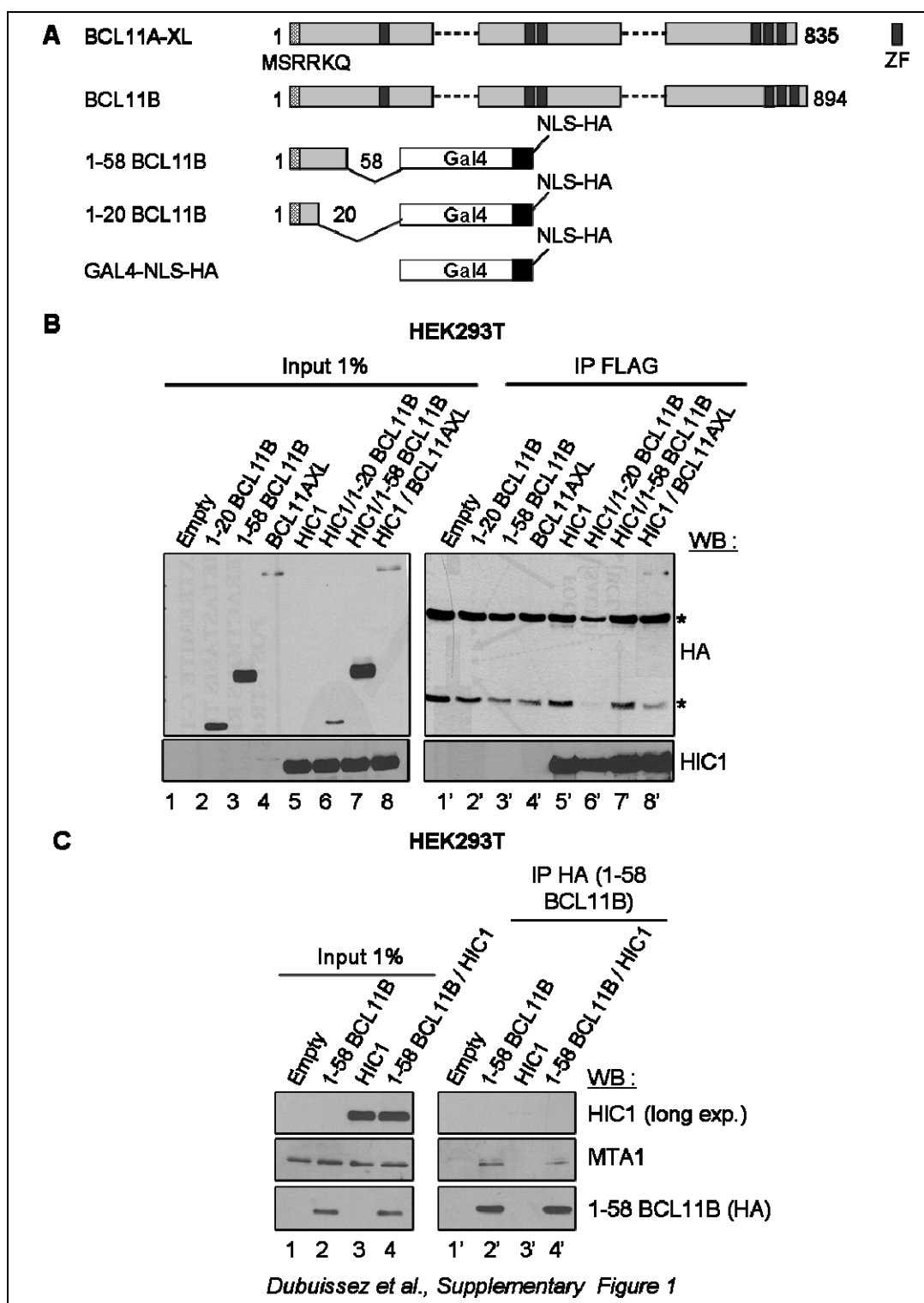


Figure 7. HIC1 and BCL11B are engaged in DNA-independent protein-protein interactions.

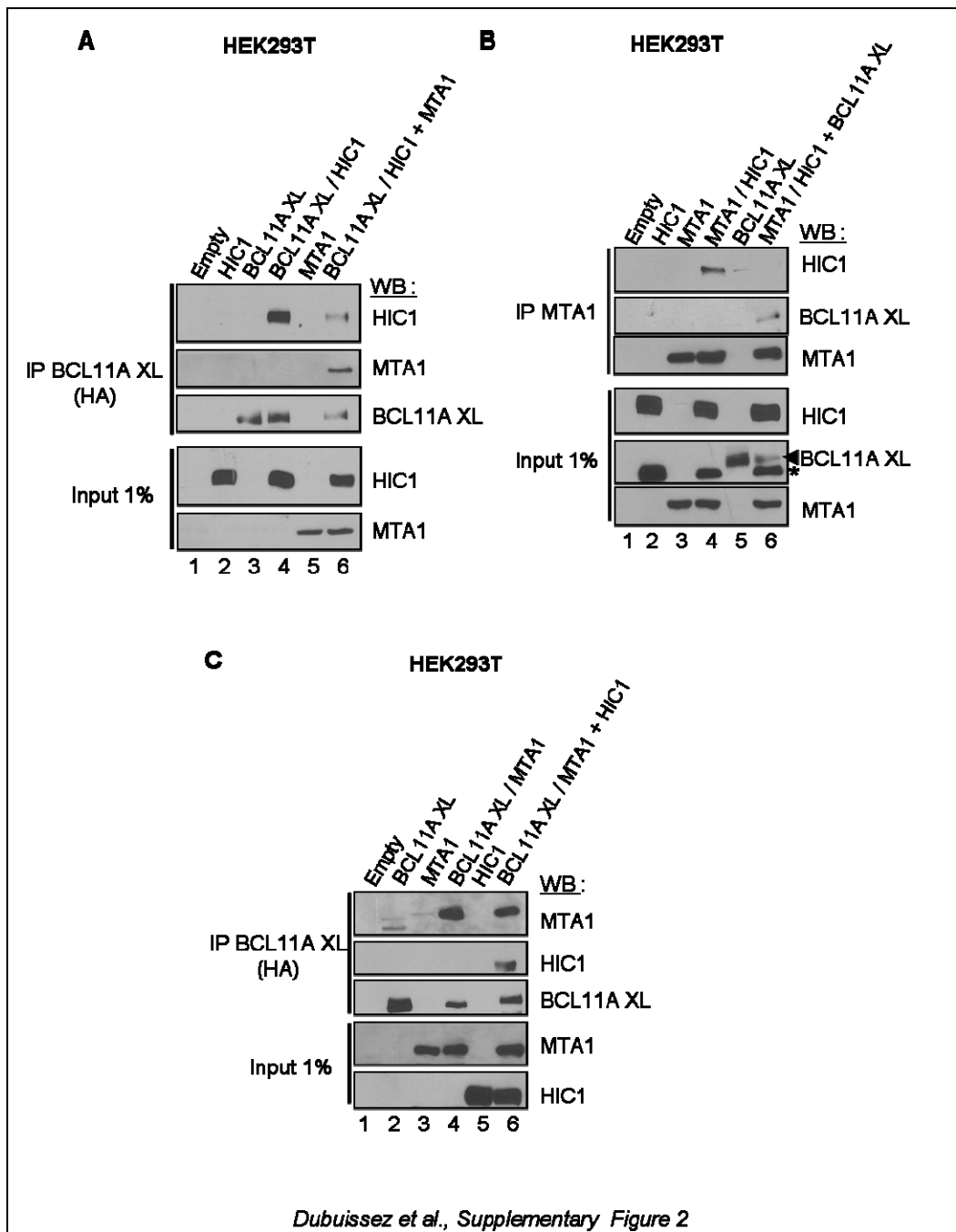
A) *HIC1 and BCL11B endogenous proteins are engaged in DNA-independent protein-protein interactions in HH lymphoid cells.* HH cells were lysed with IPH buffer and 2% of each lysate were kept as Input (lanes 1 to 3). Equal amounts of lysates were immunoprecipitated with normal mouse immunoglobulins (IgG, lane 1') or monoclonal antibodies against HIC1 in absence (lane 2') or in presence (lane 3') of 100 μ g/ml of EtdBr in the lysates and then immunoblotted with anti BCL11B antibodies. Then the membrane was stripped and blotted with polyclonal anti-HIC1 antibodies to verify the efficiency of immunoprecipitation. B) *HIC1 and BCL11B mostly interact in the soluble fraction of HH cells and not in the chromatin fraction.* The combined cytoplasmic and nucleocytoplasmic fractions (S) and the micrococcal nuclease-solubilized chromatin fractions were prepared essentially as described in Van dessel et al. (2010). 2% of each fraction were kept as Input and the remaining were used in immunoprecipitation (IP) assays with anti HIC1 monoclonal antibodies (lanes 3 and 5) or with mouse IgG (lanes 2 and 4) as controls. The Input and the immunoprecipitates (IP) were immunoblotted with anti BCL11B and anti HIC1 antibodies.



Supplementary Figure 1. The conserved N-terminal motif of BCL11B interacts with MTA1 but not with HIC1.

(A) Schematic representation of the BCL11B-Gal4-NLS-HA chimeras. The two BCL11B N-terminal fragments (1-58 and 1-20) containing the conserved MSRRKQ motif were cloned in frame with the Gal4 binding domain, a Nuclear localization signal (NLS) and an epitope tag (HA) both shown as a black box in the GAL4-NLS-HA eukaryotic vector. (B) HIC1 does not interact with the BCL11B N-terminal repression domain. HEK293T were transfected for 48h with the indicated expression vectors. Then, whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-FLAG

antibodies to immunoprecipitate HIC1 (Top panels, IP FLAG) and the immunoprecipitated material was immunoblotted with the anti-HA antibodies. The membrane was then re-probed with anti-HIC1 antibodies to verify the presence of HIC1 proteins. The co-immunoprecipitation of HA-BCL11A-XL by HIC1 (lanes 8 and 8') was used as a positive control of the HA antibodies in Western blot analyses. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Left panels, INPUT). (C) *The interaction between the BCL11B N-terminal motif and endogenous MTA1 proteins is not affected by ectopic expression of HIC1.* HEK293T cells were transfected with the 1-58 BCL11B-Gal4 chimera in absence or in presence of FLAG-HIC1 or with FLAG-HIC1 alone as control. The immunoprecipitated material was immunoblotted with the anti-HIC1 and anti-MTA1 antibodies. The membrane was then re-probed with anti-HA antibodies to verify the presence of the BCL11B-Gal4 chimera. 1% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (Left panels, INPUT). .



Supplementary Figure 2. Characterization of the HIC1-BCL11A-XL, HIC1-MTA1 and BCL11A-XL-MTA1 binary complexes in presence of MTA1, BCL11A-XL and HIC1, respectively.

A) *The HIC1-BCL11A-XL binary complex is severely disrupted in presence of MTA1.* HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combinations of HIC1, MYC-MTA1 and of HA-BCL11A-XL as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. In particular, HIC1 and BCL11A-XL were co-transfected alone (lane 4) or in presence of MTA1 (lanes 6). Cells were lysed in IPH buffer, immunoprecipitated with anti-HA (BCL11A-XL) antibodies and successively immunoblotted with anti-MYC (MTA1), anti-HIC1 and anti-HA antibodies (INPUT, Bottom three Panels, lanes 1 to 6). B) *The HIC1-MTA1 complex is dissociated by the addition of BCL11A-XL.* HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combination of HIC1, MYC-MTA1 and of HA-BCL11A-XL as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. Total cell extracts prepared in IPH

buffer were used in co-immunoprecipitation experiments followed by immunoblotting with the relevant antibodies as described in panel A). In particular, the formation of the HIC1-MTA1 binary complex was assessed in absence (lane 4) or in presence (lane 6) of co-transfected BCL11A-XL. C) *The BCL11B-MTA1 complex is not dissociated by addition of HIC1.* A similar experiment was conducted for the BCL11A-XL-MTA1 binary complex in absence (lane 4) or in presence of co-transfected HIC1 (lane 6).

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

3 Caractérisation de l'interaction entre HIC1 et MTA1

3.1 Régions de HIC1 impliquées dans l'interaction avec MTA1

Notre équipe a montré que l'interaction entre HIC1 et MTA1 est régulée par une balance entre deux MPTs ciblant la lysine K314 du motif MKHEP de HIC1 : l'acétylation et la SUMOylation. En effet, l'acétylation inhibe l'interaction alors que la SUMOylation la favorise (cf 5.8.1) (Van Rechem et al., 2010). Mais ce motif peptidique de HIC1 est-il suffisant et nécessaire pour interagir avec MTA1 ?

Nous avons donc créé deux constructions de HIC1 :

- une construction comprenant les 20 acides aminés de sa région centrale, 305 à 326, incluant le motif peptidique MKHEP, suivi d'un domaine de liaison à l'ADN de Gal4 puis, d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) et d'un épitope HA (Figure 37A).

- une correspondant à la protéine de pleine longueur déletée des 20 acides aminés incluant le motif MKHEP, HIC1 $\Delta(305-326)$ ou HIC1 Δ MKHEP (Figure 37B).

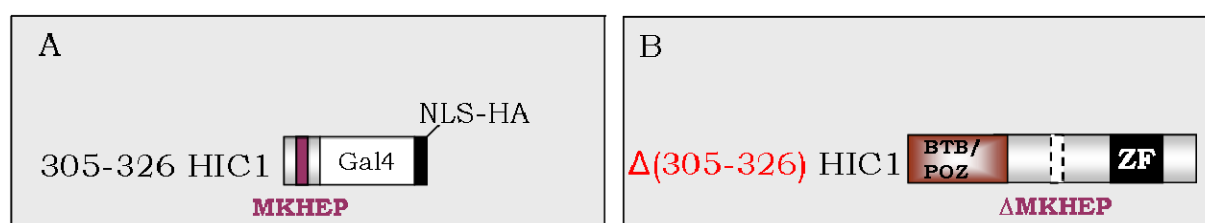


Figure 37 : Schémas des mutants de HIC1

Pour étudier leur interaction avec MTA1, nous avons réalisé des expériences de Co-IP entre ces constructions de HIC1 et MTA1 dans des cellules HEK293T.

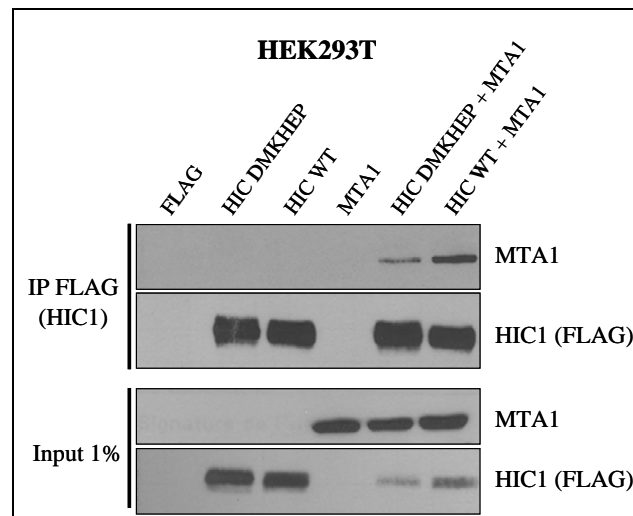


Figure 38 : Le motif MKHEP de HIC1 est impliqué dans l'interaction avec MTA1

Nous observons que les protéines MTA1 co-immunoprécipitent moins efficacement avec le mutant de HIC1 délété du motif MKHEP (Figure 38). De plus, nous avons également réalisé une expérience de Co-IP en semi-endogène où nous avons étudié l'interaction entre les protéines MTA1 endogènes et les protéines HIC1 surexprimées en HEK293T (Figure 39).

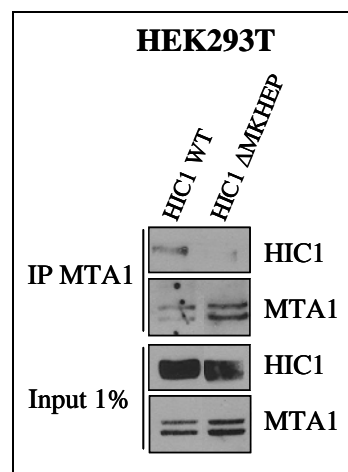


Figure 39 : Le motif MKHEP de HIC1 est nécessaire à l'interaction avec MTA1

Nous constatons que le mutant HIC1 délété du motif MKHEP ne co-immunoprécipite pas de façon significative avec les protéines MTA1

endogènes (Figure 39). Ces résultats indiquent que la région centrale de HIC1 (305 à 326 AA) incluant le motif MKHEP est essentielle pour l'interaction avec les protéines MTA1. Pour démontrer que le motif MKHEP est suffisant pour l'interaction, il fallait montrer que le fragment de HIC1 incluant le motif MKHEP interagissait avec MTA1. Nous avons donc utilisé la construction 305-326 HIC1 Gal4-NLS-HA (cf Figure 37A) et cependant, malgré plusieurs expériences de Co-IP, nous n'avons toujours pas pu montrer d'interaction avec MTA1. Pourtant, cette construction est bien fonctionnelle et constitue un domaine de répression transcriptionnelle autonome (Figure 40).

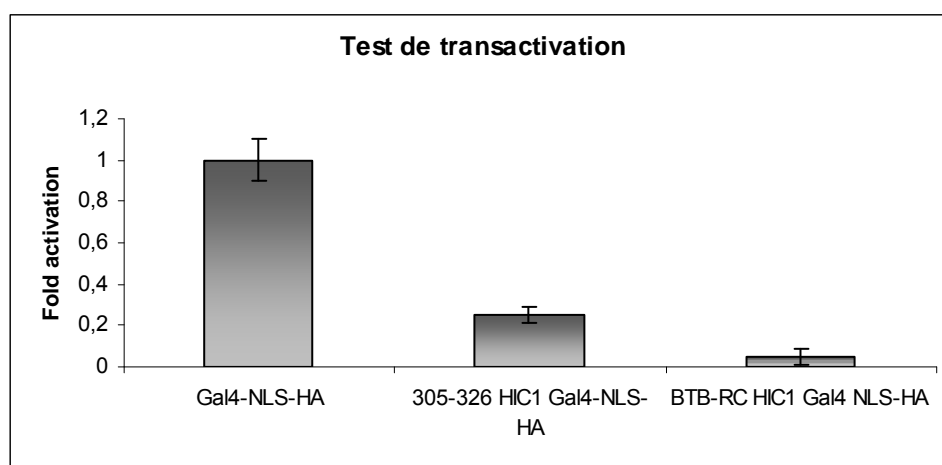


Figure 40 : Test de répression transcriptionnelle de la construction 305-326 de HIC1 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4

En effet, nous observons qu'elle réprime la transcription du gène luciférase sous le contrôle d'éléments Gal4, comme les domaines BTB-RC de HIC1 (Figure 40). Ces résultats sont difficilement interprétables. Une hypothèse plausible serait que cette région isolée de HIC1 ne serait pas structurée correctement empêchant soit, l'interaction avec MTA1 ou soit, l'immunoprécipitation avec l'anticorps. En effet, les domaines BTB/POZ et doigts de zinc de HIC1 qui sont importants pour conformer correctement la région centrale, sont absents de cette construction (Deltour et al., 2002). Contrairement au motif MSRRKQ de BCL11B, nous ne pouvons donc pas

affirmer que le motif MKHEP de HIC1 soit nécessaire et suffisant pour l'interaction avec MTA1.

3.2 Régulation de ces interactions par des modifications post-traductionnelles

3.2.1 La méthylation de MTA1

Une étude publiée en 2013, montre que MTA1 peut-être méthylée par la méthyltransférase G9a et déméthylée par LSD1 (cf 4.5.3) (Nair et al., 2013). D'une part, la méthylation de MTA1 permet le recrutement du complexe co-répresseur NuRD en favorisant l'interaction avec l'ATPase CHD4. D'autre part, les protéines MTA1 non méthylées recrutent le complexe co-activateur NuRF en permettant l'interaction avec les protéines p300 et BPTF (cf Figure 15). Donc, la méthylation de MTA1 régule son rôle répresseur ou activateur. Enfin, la lysine de MTA1 responsable de sa méthylation est localisée dans sa région C-terminale, région impliquée dans l'interaction avec les protéines BCL11 et HIC1. Nous avons donc déterminé si cette modification post-traductionnelle de l'extrémité C-terminale de MTA1 modulait l'interaction avec HIC1 et avec BCL11.

- Avec HIC1

Pour cela, nous avons d'abord étudié l'interaction par une expérience de Co-IP entre les protéines HIC1 et MTA1 surexprimées en HEK293T après transfection transitoire, en présence ou non de LSD1 qui est responsable de la déméthylation de MTA1.

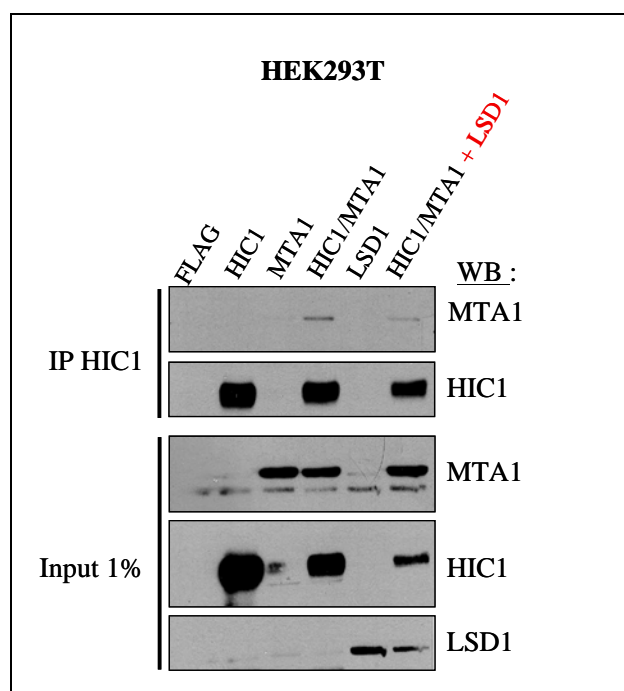


Figure 41 : La déméthylation de MTA1 par LSD1 diminue l'interaction avec HIC1

Nous observons qu'en présence de LSD1, MTA1 co-immunoprécipite moins avec HIC1 (Figure 41). Ce résultat montre que la déméthylation de MTA1 par LSD1 défavorise son interaction avec HIC1. De plus, notre équipe a montré que HIC1 interagit également avec LSD1 et que cette interaction est indépendante de MTA1 (Boulay, Thèse de Doctorat, Université de Lille 2011). En résumé, ces résultats suggèrent que HIC1 ne pourrait interagir à la fois avec MTA1 et avec LSD1.

Puis, nous avons étudié l'interaction entre les protéines endogènes HIC1 et MTA1 en présence ou non d'un inhibiteur spécifique de la méthyltransférase G9a.

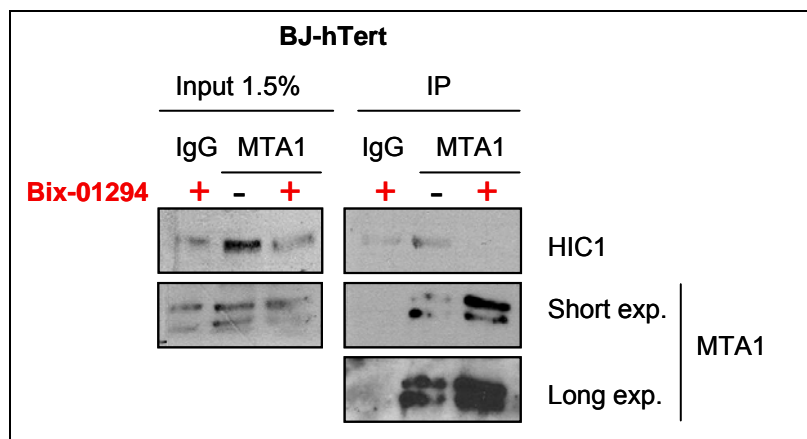


Figure 42 : La non-méthylation de MTA1 inhibe l'interaction avec la protéine HIC1

Par une expérience de Co-IP endogène dans des fibroblastes BJ-hTert, nous observons que HIC1 ne co-immunoprécipite plus avec MTA1 en présence de l'inhibiteur de la méthyltransférase G9a, Bix-01294 (Figure 42). Ce résultat indique que la non-méthylation de MTA1 inhibe l'interaction avec HIC1.

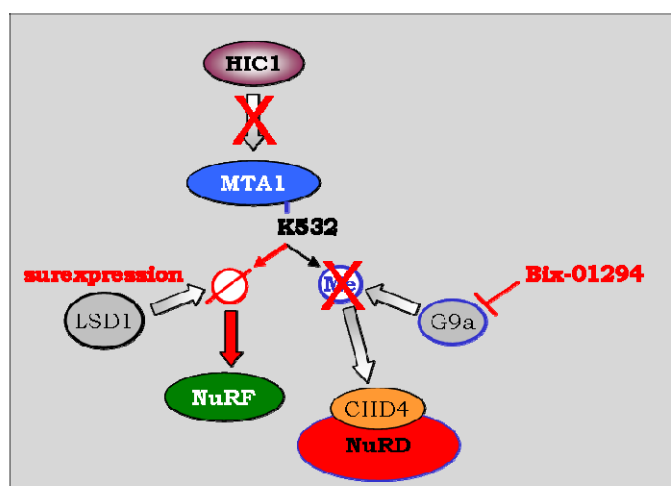


Figure 43 : Schémas récapitulatif des effets de la déméthylation de MTA1 sur l'interaction avec HIC1

En résumé, la déméthylation de MTA1 inhibant le recrutement du complexe corépresseur NuRD et favorisant le recrutement du complexe coactivateur NuRF, défavorise l'interaction avec HIC1 (Figure 43). Donc, HIC1 interagirait avec MTA1 pour recruter des complexes NuRD dotés d'une activité de

corépresseur contrairement à GATA qui recrute NuRD pour soit activer, soit réprimer la transcription (3.2.2) (Hong et al., 2005; Miccio et al., 2010). Afin de conforter ce modèle, il serait intéressant d'étudier l'interaction entre les protéines HIC1 et MTA1 endogènes en présence ou non d'un inhibiteur spécifique de LSD1. L'inhibition de LSD1 empêchant la déméthylation de MTA1 devrait favoriser la méthylation de MTA1 responsable du recrutement du complexe NuRD et donc favoriser l'interaction avec HIC1.

- Avec BCL11B

En ce qui concerne l'interaction avec BCL11B, nous avons d'abord réalisé une expérience de Co-IP en présence ou non de LSD1, enzyme responsable de la méthylation de MTA1 en HEK293T après surexpression transitoire des protéines BCL11B et MTA1.

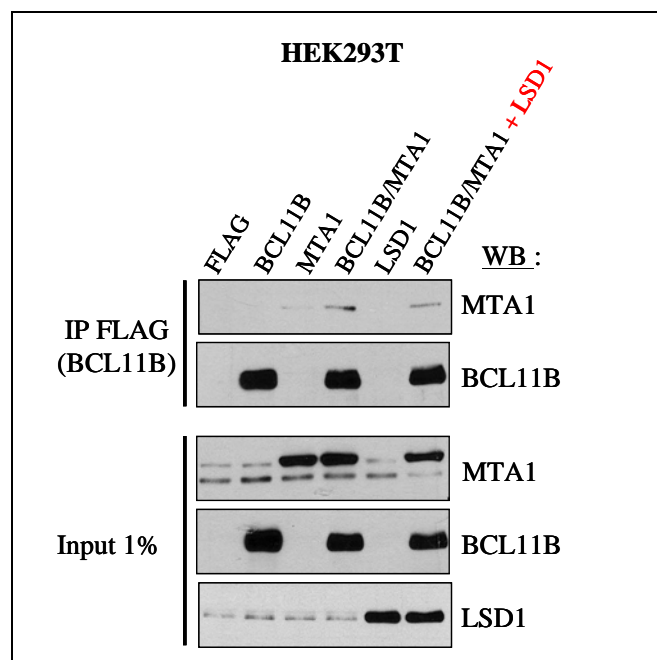


Figure 44 : La déméthylation de MTA1 diminue l'interaction avec BCL11B

Nous constatons une diminution de l'interaction entre BCL11B et MTA1 en présence de LSD1. Dans les thymocytes murins en différenciation, l'activation d'Id2 a lieu en présence de Mta2 au promoteur contrairement à ce que nous avons montré dans le cas de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ humains (Publication n°1) (Zhang et al). Il serait donc intéressant

d'étudier si dans ce contexte particulier MTA1 est déméthylée. De plus, BCL11B est également capable d'interagir avec LSD1 pour réprimer la transcription du VIH (cf 6.3.5) (Le Douce et al., 2012).

3.2.2 La SUMOylation et le motif SIM (SUMO-interacting Motif) de MTA1

Une étude récente montre que MTA1 est SUMOylée sur la lysine 509 afin de réguler son activité de co-répresseur transcriptionnel. De plus, cette SUMOylation est dépendante d'un motif SIM localisé dans sa région C-terminale (cf 4.5.2) (Cong et al., 2011). Etant donné que la SUMOylation de HIC1 favorise son interaction avec MTA1, nous nous sommes demandés si la SUMOylation de MTA1 influençait également l'interaction avec HIC1. Pour cela, nous avons étudié en HEK293T, les interactions entre HIC1 et MTA1 par Co-IP avec un mutant non SUMOylable, K509R, de MTA1, aimablement fourni par le Pr R. Kumar.

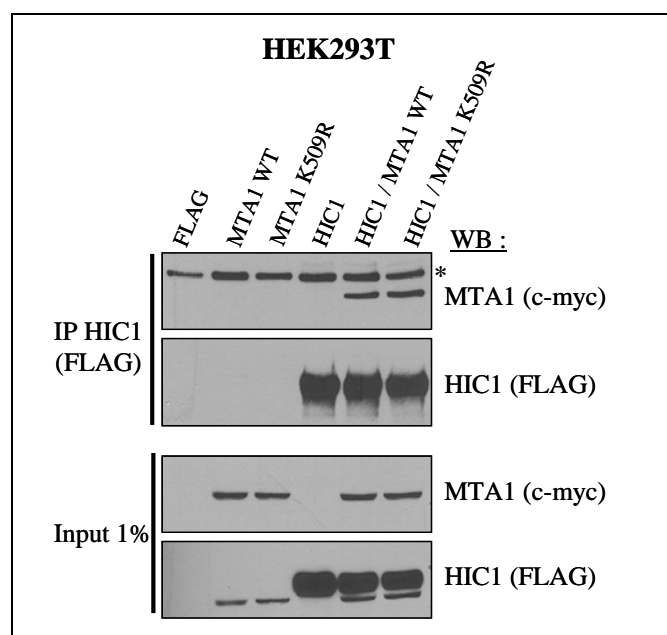


Figure 45 : La SUMOylation de MTA1 n'influence pas l'interaction avec HIC1.

(* représente une bande non spécifique)

Nous constatons que MTA1 K509R co-immunoprécipite avec HIC1 de la même façon que MTA1 WT (Figure 45). Donc, la SUMOylation de MTA1 ne module pas l'interaction avec HIC1.

Ensuite, nous avons étudié si le motif SIM localisé dans la région C-terminale de MTA1, était important pour l'interaction avec HIC1 sachant que l'extrémité C-terminale de MTA1 a été isolée en crible double-hybride avec comme appât HIC1 (Van Rechem et al., 2010). Nous avons donc réalisé une Co-IP entre HIC1 et MTA1 muté dans son motif SIM, mutant MTA1 AAA, aimablement fourni par le Pr R. Kumar.

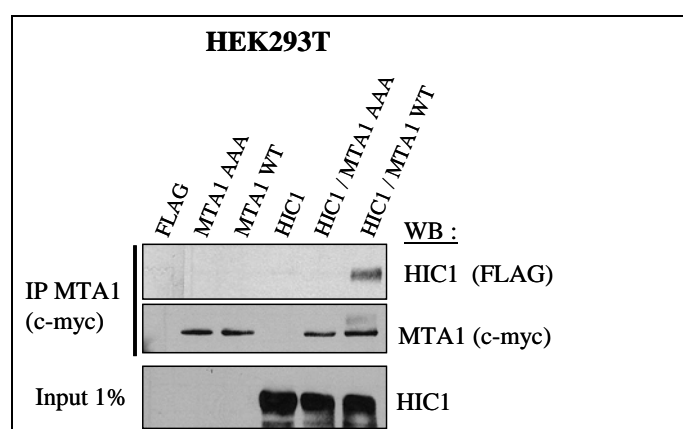


Figure 46 : Le motif SIM de MTA1 est impliqué dans l'interaction avec HIC1

Nous remarquons que HIC1 ne co-immunoprécipite plus avec MTA1 AAA ce qui indique que le motif SIM de MTA1 est indispensable à l'interaction avec HIC1 (Figure 46). En effet, MTA1 AAA n'est plus capable d'interagir avec les protéines SUMO1 et SUMO2 (Cong et al., 2011) et, la SUMOylation de HIC1 favorise l'interaction avec MTA1 (Dehennaut et al., 2013b). Donc la SUMOylation de HIC1 serait nécessaire à l'interaction avec MTA1 via son motif SIM.

3.3 Rôle de l'interaction HIC1-MTA1 dans la réponse immunitaire

Pour étudier un éventuel rôle de HIC1 dans la réponse immunitaire, nous avons utilisé les mêmes échantillons de lymphocytes T CD4⁺ humains (LT

CD4⁺) que ceux utilisés pour étudier BCL11B (cf). Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de HIC1 lors de l'activation des LT CD4⁺.

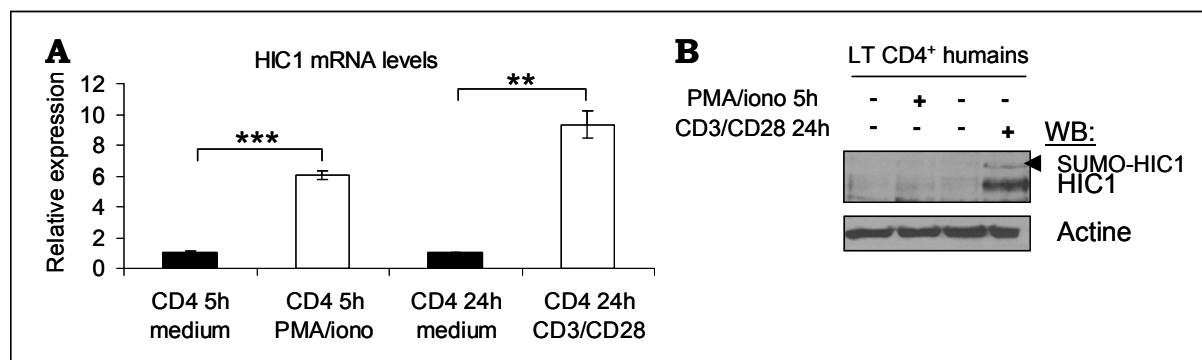


Figure 47 : L'activation des lymphocytes T CD4⁺ induit l'activation de HIC1 au niveau ARN (A) et au niveau protéique (B). La flèche noire représente une forme potentiellement SUMOylée de HIC1.

Suite à l'activation des LT CD4⁺ par les antigènes CD3/CD28, nous constatons une augmentation de l'expression de HIC1 tant au niveau ARN que protéique (Figure 47A, B). En revanche, nous n'observons pas d'augmentation au niveau protéique de HIC1 malgré une augmentation au niveau ARN dans les LT CD4⁺ activés par le couple PMA/ionomycine (Figure 47A, B). Pour la suite de l'étude, nous nous sommes donc focalisés sur le rôle de HIC1 lors de l'activation des LT CD4⁺ par les antigènes CD3/CD28. De plus, cette activation mime de façon physiologique l'activation du TCR des LT CD4⁺. Ce résultat suggère que HIC1 pourrait jouer un rôle important dans l'activation des LT CD4⁺ et donc lors de la réponse immunitaire. De plus, sur le SDS-PAGE, nous observons une bande au-dessus de celle correspondante à HIC1, nous suggérons qu'il pourrait s'agir de la forme SUMOylée de HIC1 (Figure 47B). Afin de le déterminer, nous pourrions activer les LT CD4⁺ par les antigènes CD3/CD28 en présence ou non de Calyculin A, un inhibiteur de phosphatases mais aussi de SUMOylation.

Ensuite, pour déterminer dans quelles populations de lymphocytes T CD4⁺ l'expression de HIC1 est activée, les LT CD4⁺ régulateurs (CD25⁺), les LT CD4⁺ mémoires (CD45RA⁻) et les LT CD4⁺ naïfs (CD45RO⁻) ont été purifiés à partir d'une poche de sang humain en fonction des marqueurs exprimés à

leur surface membranaire. Puis, ces différentes populations ont été activées ou non par les antigènes CD3/CD28 pendant 24h.

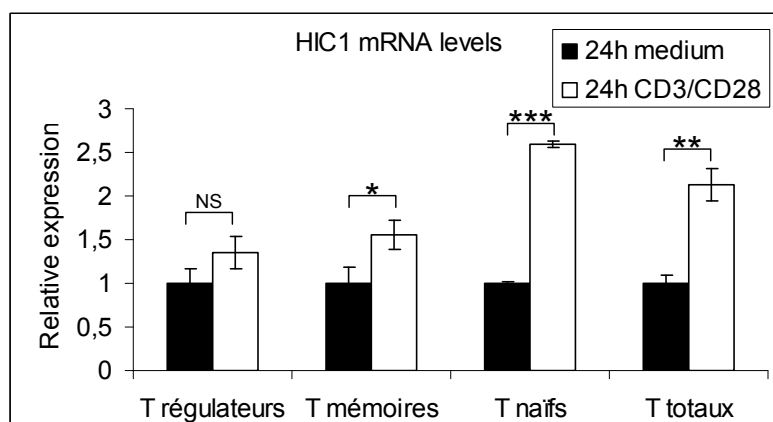


Figure 48 : Etude de l'activation de HIC1 au niveau ARN entre les populations différentes de lymphocytes T CD4⁺ activés ou non

Le résultat des expériences de qRT-PCR suggèrent que l'activation de l'expression de HIC1 se déroule préférentiellement dans les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Figure 48).

Nous émettons l'hypothèse que dans les LT CD4⁺ activés, l'augmentation de l'expression et de la SUMOylation de HIC1 favoriserait son rôle de répresseur transcriptionnel en recrutant le complexe NuRD via MTA1.

Pour le démontrer, nous nous sommes intéressés aux gènes cibles de HIC1 tel que le récepteur CXCR7 (cf 5.6.5) (Van Rechem et al., 2009a). Dans les lymphocytes T, ce récepteur a été identifié comme le deuxième récepteur de SDF1 (Stromal cell-Derived Factor 1), le premier étant CXCR4 (Balabanian, 2005). SDF1 est un puissant chimioattractant qui régule la migration et le « homing » des cellules de l'immunité vers les lieux d'infection et ganglions lymphatiques. De plus, des expériences de microarrays dans des fibroblastes BJ-hTert dont l'expression de *HIC1* a été invalidée par siRNA (SiHIC1) et réalisées par Vanessa Dehennaut en collaboration avec Brian Rood, ont montré une augmentation de l'expression de *SDF1* (1,63x), *Cyclin D1* (1,44x) et *SIRT1* (1,45x) par rapport aux BJ SiCtrl. Donc, *SDF1* serait un autre gène cible potentiel de HIC1.

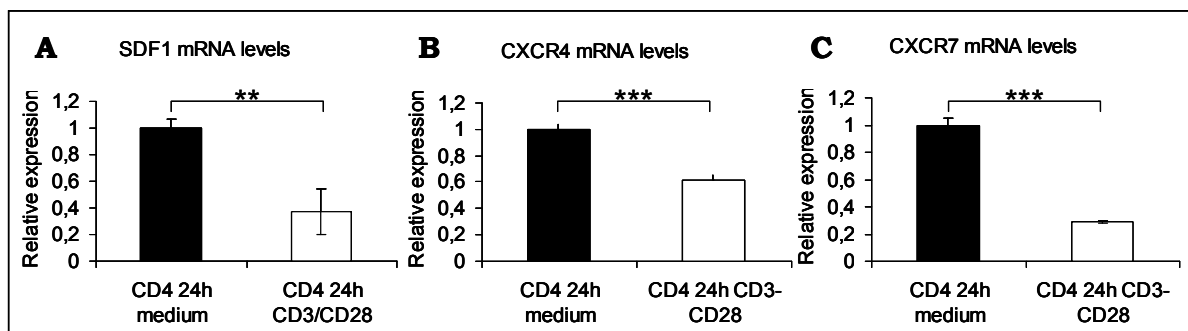


Figure 49 : L’activation des lymphocytes T CD4+ induit la diminution de l’expression des récepteurs CXCR4 (B), CXCR7 (C) et de leur ligand commun SDF1 (A).

D’après les expériences de qRT-PCR, nous observons une diminution de l’expression de *SDF1*, *CXCR4* et *CXCR7* dans les LT CD4+ activés (Figure 49). Ces résultats corrént avec le fait que *CXCR7* soit un gène cible direct de HIC1. L’expression de HIC1 étant augmentée dans les LT CD4+ activés, il pourrait réprimer l’expression de *CXCR7*. De plus, *CXCR4* et *SDF1* étant également réprimés dans les CD4+ activés, ils pourraient être des gènes cibles potentiels de HIC1.

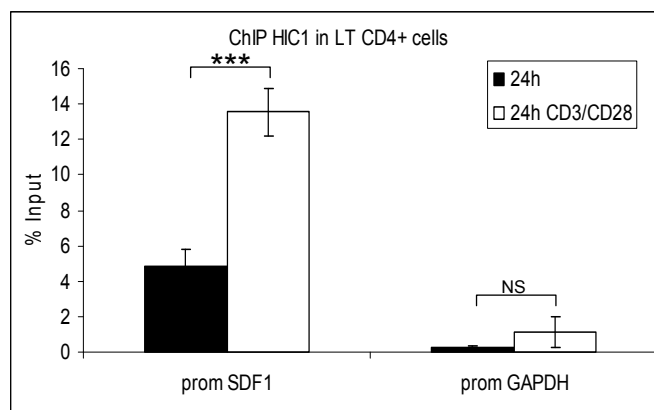


Figure 50 : HIC1 se fixe sur le promoteur de SDF1 dans les LT CD4+

Une expérience d’immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) dans les LT CD4+ activés ou non avec le couple d’antigènes CD3/CD28, nous a permis de démontrer la fixation spécifique de HIC1 sur le promoteur de *SDF1* au niveau d’un site HiRE que nous avons identifié (Figure 50). De manière plus

précise, nous constatons une augmentation du recrutement de HIC1 au promoteur de *SDF1* lors de l'activation du TCR des lymphocytes T CD4⁺.

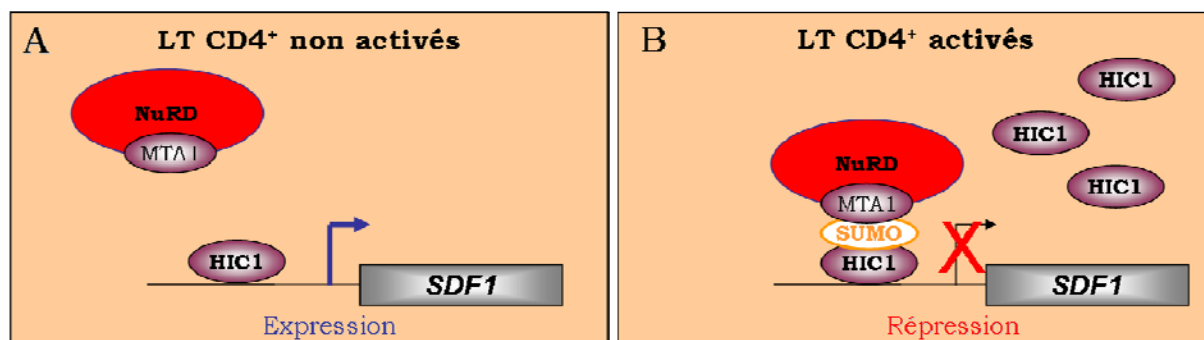


Figure 51 : Modèle du rôle de HIC1 dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺

En résumé, HIC1 se fixe sur le promoteur de *SDF1* dans les LT CD4⁺ non activés (Figure 51A). Suite à l'activation des LT CD4⁺, l'expression de HIC1 est activée, HIC1 SUMOylée est alors recrutée au niveau du promoteur de *SDF1* pour réprimer la transcription. De plus, afin de prouver que HIC1 recrute MTA1 pour réprimer l'expression de *SDF1*, il serait nécessaire de réaliser des expériences d'immunoprécipitations séquentielles de la chromatine (ChIP-reChIP) (Figure 51B).

Ces résultats mettent en évidence un nouveau gène cible direct de HIC1, *SDF1* et suggèrent un rôle de HIC1 dans l'activation du TCR des LT CD4⁺.

4 Publication n°3

The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1).

Biochem. Biophys. Res. Commun. (2013) 440, 424–430

Dubuissez, M., Faiderbe, P., Pinte, S., Dehennaut, V., Rood, B.R., and Leprince, D.

Cette étude a permis d'identifier deux nouveaux gènes cibles directs de HIC1 : *ApoER2* et *VLDLR* codant tous deux des récepteurs ayant pour ligand commun la Reelin. La voie Reelin joue un rôle important dans la migration des précurseurs neuronaux au cours du développement du cervelet.



The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1)



Marion Dubuissez^a, Perrine Faiderbe^a, Sébastien Pinte^a, Vanessa Dehennaut^{a,1}, Brian R. Rood^{a,b}, Dominique Leprince^{a,*}

^a CNRS-UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université de Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue Calmette, BP447, 59017 Lille Cedex, France

^b Division of Oncology, Children's Research Institute, Children's National Medical Center, 111 Michigan Ave., NW Washington, DC 20010, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2013

Available online 25 September 2013

Keywords:

HIC1
ApoER2
VLDLR
Tumor suppressor
Lissencephaly
Miller–Dieker syndrome
Purkinje cells

ABSTRACT

The tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) is located in 17p13.3 a region frequently hypermethylated or deleted in tumors and in a contiguous-gene syndrome, the Miller–Dieker syndrome which includes classical lissencephaly (smooth brain) and severe developmental defects. *HIC1* encodes a transcriptional repressor involved in the regulation of growth control, DNA damage response and cell migration properties. We previously demonstrated that the membrane-associated G-protein-coupled receptors *CXCR7*, *ADRB2* and the tyrosine kinase receptor *EphA2* are direct target genes of HIC1. Here we show that ectopic expression of HIC1 in U2OS and MDA-MB-231 cell lines decreases expression of the *ApoER2* and *VLDLR* genes, encoding two canonical tyrosine kinase receptors for Reelin. Conversely, knock-down of endogenous *HIC1* in BJ-Tert normal human fibroblasts through RNA interference results in the up-regulation of these two Reelin receptors. Finally, through chromatin immunoprecipitation (ChIP) in BJ-Tert fibroblasts, we demonstrate that HIC1 is a direct transcriptional repressor of *ApoER2* and *VLDLR*. These data provide evidence that HIC1 is a new regulator of the Reelin pathway which is essential for the proper migration of neuronal precursors during the normal development of the cerebral cortex, of Purkinje cells in the cerebellum and of mammary epithelial cells. Deregulation of this pathway through *HIC1* inactivation or deletion may contribute to its role in tumor promotion. Moreover, HIC1, through the direct transcriptional repression of *ATOH1* and the Reelin receptors *ApoER2* and *VLDLR*, could play an essential role in normal cerebellar development.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The extracellular matrix protein Reelin mediates a key signaling pathway implicated in the regulation of neural progenitor cell migration and positioning during the early development of cortical structures in the brain [1,2]. Canonical Reelin signaling relies on two membrane bound receptors, the Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2), also known as Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 8 (LRP8), and the Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR); both of which are members of the LDL receptor family associated with cellular cholesterol homeostasis [3]. Binding of Reelin leads to clustering of the receptors and subsequent tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic adaptator protein Disabled 1 (DAB1) associated with the intracellular domain of both receptors [4,5]. Phosphorylated DAB1 recruits several proteins to activate downstream signaling to promote neural migration and also inter-

acts with LIS1 to remodel microtubules. Mice harboring null mutations in key components of the Reelin signaling including *Reelin* itself (*reeler* mice), *Dab1*, and double *VLDLR/ApoER2* homozygous mutants all manifest *reeler-like* phenotypes characterized by severe aberrations in cortical layering [5]. In humans, mutations in the Reelin pathway have been associated with lissencephaly, epilepsy and Alzheimer's disease [1].

Besides its crucial physiological function in the brain, Reelin is also expressed in several other non-neural tissues. Notably, Reelin is essential for cell migration and ductal patterning during normal mammary gland development, is expressed in the normal breast epithelium [6] and deregulation of this signaling pathway has been associated with tumorigenesis. However, contradictory results have been described since both increased and epigenetically silenced expression of Reelin has been observed in different cancer types. Its silencing, associated with promoter hypermethylation, is correlated with poor prognosis in breast cancer and ectopic expression of Reelin has been shown to suppress cell migration and metastatic properties of MDA-MB-231 breast cancer cells [7]. Strikingly, very few studies have investigated the expression levels and possible significance of the *ApoER2* and *VLDLR* receptors in tumors. Type I

* Corresponding author. Fax: +33 3 20 87 11 11.

E-mail address: dominique.leprince@ibl.fr (D. Leprince).

¹ CNRS-UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille 1, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

(full-length) *VLDLR* is overexpressed in well-differentiated intestinal carcinoma and in gastric adenocarcinoma as compared to adjacent normal tissues [8] whereas up-regulation of Type II *VLDLR*, a splice variant lacking exon 16, is correlated with a higher metastatic potential in gastric and breast cancers [9]. *VLDLR* and *ApoER2* are expressed at various levels in neuroblastoma cell lines and also in primary tumors [10].

HIC1 (*Hypermethylated In Cancer 1*) is a tumor suppressor gene located at 17p13.3, a region frequently hypermethylated or deleted in numerous cancers including those of breast, lung, ovary, liver, colon, kidney and brain [11]. This loss of heterozygosity is particularly frequent in childhood brain tumors including medulloblastoma, ependymoma, and high grade glioma [12]. The tumor suppressor gene status of *HIC1* has been confirmed by animal models; heterozygous *Hic1*^{+/-} mice develop an age- and gender-dependent spectrum of spontaneous tumors [13]. In addition, homozygous loss of *Hic1* is marked by several abnormalities (perinatal death, small size, acrania, exencephaly, craniofacial abnormalities, limb defects and omphalocele) very similar to those found in a severe form of lissencephaly, the Miller–Dieker syndrome (MDS) [14]. MDS is a contiguous-gene syndrome marked by deletion of *LIS1* and of multiple genes in a 17p13.3 critical region including *HIC1* [15]. *HIC1* encodes a sequence-specific transcriptional repressor consisting of three main functional domains: a BTB/POZ protein–protein interaction domain (Broad complex, Tramtrack and Bric à brac/POX viruses and Zinc finger) in the N-terminal part of the protein, a central region and a C-terminal domain containing five Krüppel-like C2H2 zinc fingers. These zinc fingers allow the specific binding of the protein to specific DNA sequences consisting of a 5'-(C/G)NG(C/G)GGCA(C/A)CC-3' centered on a GGCA motif and named *HIC1* responsive elements (*HiRE*). *HIC1* recruits several co-repressor complexes; CtBP, NuRD, SWI/SNF and Polycomb PRC2 [12]. Among the 12 *HIC1* direct target genes described to date, half have been identified through four independent gene profiling experiments using its forced re-expression in *HIC1*-deficient tumor cell lines [12]. Notably, several validated target genes encode membrane-associated receptors implicated in cell migration such as the G-protein-coupled receptors (GPCR) CXCR7 and ADRB2 as well as the tyrosine kinase receptor, EphA2 and its cell-bound ligand ephrinA1 [16–19]. In our list of potential candidate *HIC1* target genes generated from *HIC1* re-expression in U2OS osteosarcoma cells, we decided to validate another membrane-bound tyrosine kinase receptor, *ApoER2*.

In this study, we demonstrate that the two genes encoding canonical Reelin receptors *ApoER2* and *VLDLR* are *bona fide* *HIC1* target genes through overexpression of *HIC1* in U2OS osteosarcoma cells and MDA-MB-231 breast cancer cells. Furthermore, *HIC1* directly regulates *ApoER2* and *VLDLR* expression in normal BJ-Tert human fibroblasts as demonstrated by siRNA interference and by chromatin immunoprecipitation (ChIP) of endogenous *HIC1*.

As a whole, our results identify the two canonical receptors for Reelin as two new *HIC1* direct target genes.

2. Material and methods

2.1. Cell lines and retroviral infection

U2OS, MDA-MB-231 and BJ-Tert cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, non-essential amino acids and gentamycin. Cells were cultured at 37 °C in water-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Retroviral infection of U2OS osteosarcoma cells and MDA-MB-231 breast cancer cells with the pBABE-Puro-FLAG-*HIC1* and the empty pBABE vector were performed as previously described [18].

2.2. Small interfering RNA

BJ-Tert fibroblasts were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 10nM small interfering RNA targeting *HIC1* (*HIC1* siGENOME SMART Pool M-006532-01, Dharmacon) or a scrambled control sequence (si Ctrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon) as previously described [20].

2.3. Quantitative RT-PCR

Total RNA was reverse transcribed using random primers and MultiScribe™ reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis was performed by Power SYBR Green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized with respect to 18S RNA used as internal control [17,21]. The primers used for the qRT-PCR analyses reported in this study are summarized in Supplementary Table 1. *p*-values were calculated according to the Student test. *indicates *p* < 0.1; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

2.4. Chromatin immunoprecipitation

BJ-Tert cells were fixed by adding formaldehyde directly into the cell plate to a final concentration of 1% for 15 min at 37 °C. Adding glycine to a final concentration of 0.125 M stopped the cross-linking. After 5 min at 37 °C, cells were lysed directly in the plates by resuspension in cell lysis buffer (5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0.5% NP-40) for 5 min. Then, the samples were pelleted, resuspended in 100 μl of nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 0.2% SDS), and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a BioRuptor (Diagenode, Liege, Belgium). 20 μg of chromatin was immunoprecipitated by anti-*HIC1* antibody or IgG control [17] and classical or real-time PCR analyses were performed as already described [16,22]. The primers used are summarized in Supplementary Table 2.

2.5. Western blotting and antibodies

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE healthcare). Western blot analyses were performed as previously described [21]. The anti-*HIC1* antibody has been previously described [22] and anti-EphA2 and anti-actin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

3. Results

3.1. The two Reelin receptors *ApoER2* and *VLDLR* are *HIC1* target genes

Through gene profiling experiments, we previously generated a list of genes repressed in *HIC1*-null U2OS osteosarcoma cells following adenoviral infection and re-expression of *HIC1* which allowed us to validate several membrane-bound receptors as direct *HIC1* target genes [16–18]. In this list, *ApoER2*, coding for one of the two Reelin receptors, appears as another membrane-associated receptor which could be a new candidate *HIC1* target gene strongly repressed at the earlier post-infection time points (Fig. 1A). To further test this hypothesis, we first investigated the effects of *HIC1* ectopic expression in two *HIC1*-deficient cell lines; the osteosarcoma cells U2OS and the breast cancer cells, MDA-MB-231. After retroviral infection of these two cell lines with pBABE-FLAG-*HIC1*, we observed a significant increase in *HIC1* RNA and protein levels in comparison with the cells infected with the empty pBABE

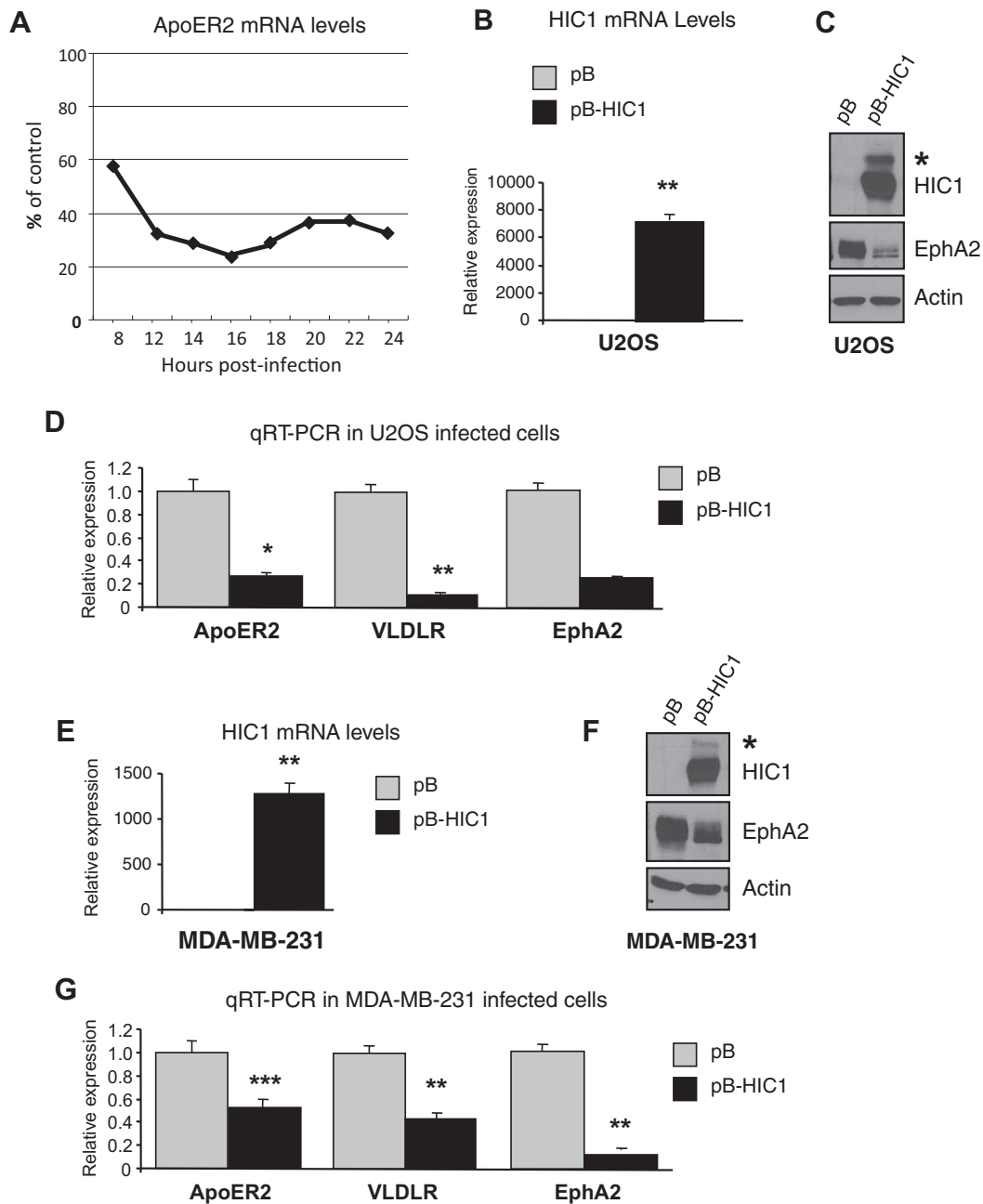


Fig. 1. *ApoER2* and *VLDLR* are down-regulated in pBabe-HIC1 infected U2OS and MDA-MB-231 cells. (A) Effects of HIC1 overexpression on *ApoER2* mRNAs level in infected cells. Total RNAs from U2OS cells (HIC1 null) infected with Ad-FLAG-HIC1 and Ad-GFP were prepared at the indicated times (from 8 to 24 h) and Affymetrix HG U133A chips were used to measure the gene expression. Expression values were normalized to Ad-GFP infected control cells at the same time points. "% of control" corresponds to the ratio between the expression levels of *ApoER2* measured in Ad-GFP and Ad-FLAG-HIC1 infected cells at each time point. (B) Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) analyses of *HIC1* and (C) Western blot (WB) analyses of HIC1 and of EphA2 used as positive control in U2OS cells infected with pBabe-FLAG-HIC1 or pBabe-FLAG (pBabe) as control, abbreviated as pB-HIC1 and pB respectively, in all figures. Actin protein levels were used as a loading control. (D) qRT-PCR analyses of *ApoER2* and *VLDLR*, in U2OS cells infected by pB-HIC1 or by pB, as control. *EphA2* was used as positive control. Values were normalized to 18S. (E) qRT-PCR analyses of *HIC1* and (F) Western blot (WB) analyses of HIC1 in infected MDA-MB-231 cells. * corresponds to SUMOylated form of HIC1. (G) qRT-PCR analyses of *ApoER2* and *VLDLR* in MDA-MB-231 cells.

vector. This *HIC1* expression correlated with a strong repression of *EphA2*, used as a control HIC1-target gene (Fig. 1B–F) [18]. As measured by qRT-PCR analyses, re-expression of HIC1 resulted in a significant decrease in mRNAs levels of *ApoER2* in both cell types (Fig. 1D and G). Interestingly, we obtained similar results for the second related Reelin receptor *VLDLR* which was absent in our microarray analyses (absent call). Conversely, to confirm the role of HIC1 in the regulation of the *ApoER2* and *VLDLR* genes, we inactivated endogenous *HIC1* expression in normal BJ-Tert fibroblasts

by RNA interference. Transfection of these cells with a pool of four siRNAs targeting HIC1 results in the efficient inhibition of endogenous *HIC1* expression and leads to a robust concomitant increase of *VLDLR* mRNA levels as well as a moderate increase in *ApoER2* and *EphA2* (used as a positive control) mRNA levels (Fig. 2). These observed effects were not owing to off target effects, since similar results were obtained after transfection of individual siRNAs targeting HIC1, as previously described [20] (data not shown). Therefore, our results strongly suggest that the two genes coding

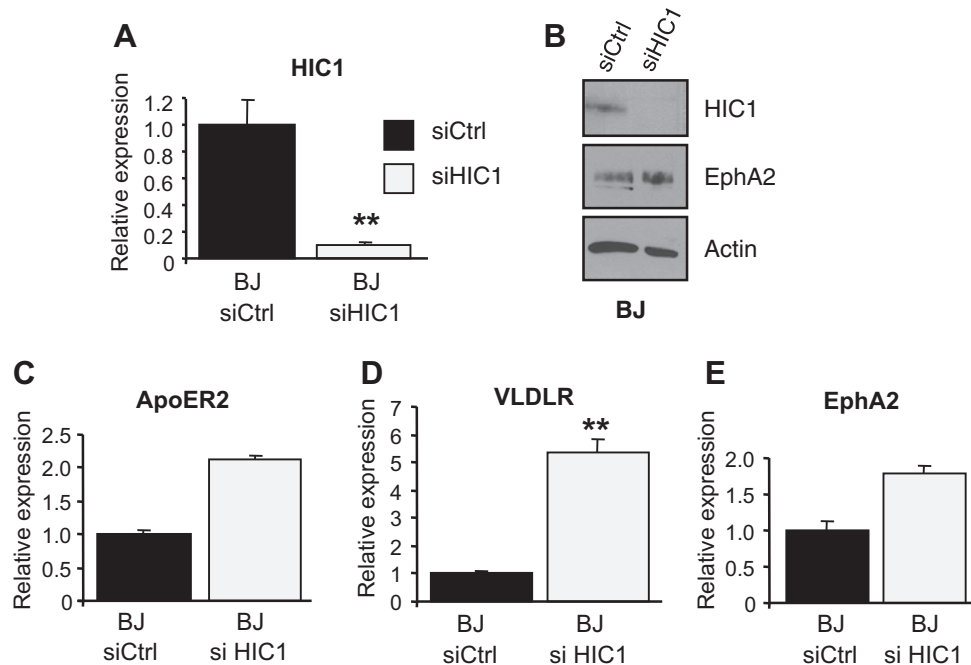


Fig. 2. Knock-down of endogenous *HIC1* in normal BJ-Tert fibroblasts up-regulates *ApoER2* and *VLDLR* expression. BJ-Tert fibroblasts were transfected with non-target siRNA control (siCtrl) or with *HIC1* siRNA pool (siHIC1). 72 h later, cells were harvested for RNA/protein extraction. Total RNAs were extracted and the mRNA expression levels of relevant genes were assessed by qRT-PCR. Values were normalized to *18S*. (A) and (B) qRT-PCR and Western blot showing siRNA knockdown of *HIC1* and a concomitant increase of *EphA2* protein as a positive control. (C) and (D) qRT-PCR analyses of *ApoER2* and *VLDLR* in human BJ-Tert fibroblasts transfected with a non-targeting control siRNA (siCtrl) or with a pool of siRNAs targeting *HIC1* (siHIC1). (E) *EphA2* was used as positive control.

for functionally distinct but related receptors for Reelin, *ApoER2* and *VLDLR* are both target genes of *HIC1* mediated transcriptional repression.

3.2. *HIC1* directly represses the expression of *ApoER2* and *VLDLR*

To determine whether *ApoER2* and *VLDLR* are *HIC1* direct target genes, we first performed CLUSTAL alignments of the upstream promoter region and first coding exons of the human and murine loci and searched for the presence of consensus *HIC1*-responsive elements (HiREs) to which *HIC1* could bind [23]. Based only on the GGCA core motif, we identified a cluster of three phylogenetically conserved and adjacent putative HiREs in the same orientation downstream of the *ApoER2* transcription start site and two isolated HiREs in the opposite orientation in the 5'-untranslated region of *VLDLR* (Fig. 3A). Next, we attempted to design a set of oligonucleotides to PCR amplify the regions containing the putative HiRE in each gene (arrows in Fig. 3A) in DNA samples obtained from Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of endogenous *HIC1* in BJ-Tert fibroblasts. Despite numerous attempts, we were unable to design a pair of primers able to efficiently amplify in quantitative ChIP-PCR analyses, only one PCR product according to the melting curve in the relevant region of the *ApoER2* 5'-untranslated region, perhaps due to its high GC content (data not shown). Nevertheless, as shown in Fig. 3B, we were able to specifically amplify the relevant regions of *ApoER2* and *SIRT1* (used as a control *HIC1* target gene), by performing classical PCR followed by agarose gel electrophoresis [24], in chromatin immunoprecipitated with anti-*HIC1* antibody but not with non-relevant rabbit IgG. Primers designed to amplify the *GAPDH* promoter were used as a negative control. By contrast, for *VLDLR*, we obtained a set of oligonucleotides that was suitable for ChIP-qPCR analyses and clearly demonstrated specific binding of *HIC1* on this site (Fig. 3C). *EphA2* and *GAPDH*, used for a control *HIC1* target gene and a non-relevant gene respectively, were also tested. Taken together these results

demonstrate that *ApoER2* and *VLDLR* are two new *HIC1* direct target genes and that *HIC1* could regulate the Reelin-Dab1 pathway through direct transcriptional repression of the two canonical Reelin receptors.

4. Discussion

In this study, we characterized the two canonical Reelin Receptors *ApoER2* and *VLDLR* as two new target genes of *HIC1*, thus demonstrating that *HIC1* could directly regulate the Reelin-DAB1 signaling pathway which plays an essential role during the development of the brain by guiding the migration and correct positioning of neural cells (Fig. 4) [1,5].

HIC1 is a tumor suppressor gene central to complex regulatory loops, involving the tumor suppressors genes *P53* and *E2F1* as well as the deacetylase *SIRT1*, that regulate growth and cell survival in response to stresses such as DNA damage. In line with these functions, *HIC1* regulates transcription of *SIRT1* itself and of several cell cycle regulatory genes such as *cyclin D1* and the cell cycle inhibitors *P57^{Kip1}* and *P21^{Waf1}* [12,21].

The lack of complete genome-wide screens for *HIC1* target genes from comparisons of *HIC1* knock-out versus normal cells or from CHIP-seq analyses preclude gene ontology analyses. Nevertheless, one category of genes that is clearly over-represented among the very few *HIC1* target genes identified to date is membrane bound receptors involved in cell migration and homing properties, including *CXCR7*, *ADRB2*, *EphA2* and its cell surface ligand *ephrin A1* [12]. The present study has added two other members to this group, *ApoER2* and *VLDLR*, encoding the two canonical receptors for Reelin (Fig. 4). As the Reelin pathway is essential for mammary gland development, these results strongly suggest that the loss of *HIC1* expression by promoter hypermethylation or loss of heterozygosity could contribute to early tumorigenesis in part through deregulation of the *EphA2/ephrinA1* and Reelin pathways in breast cancers and perhaps more generally in epithelial cancers.

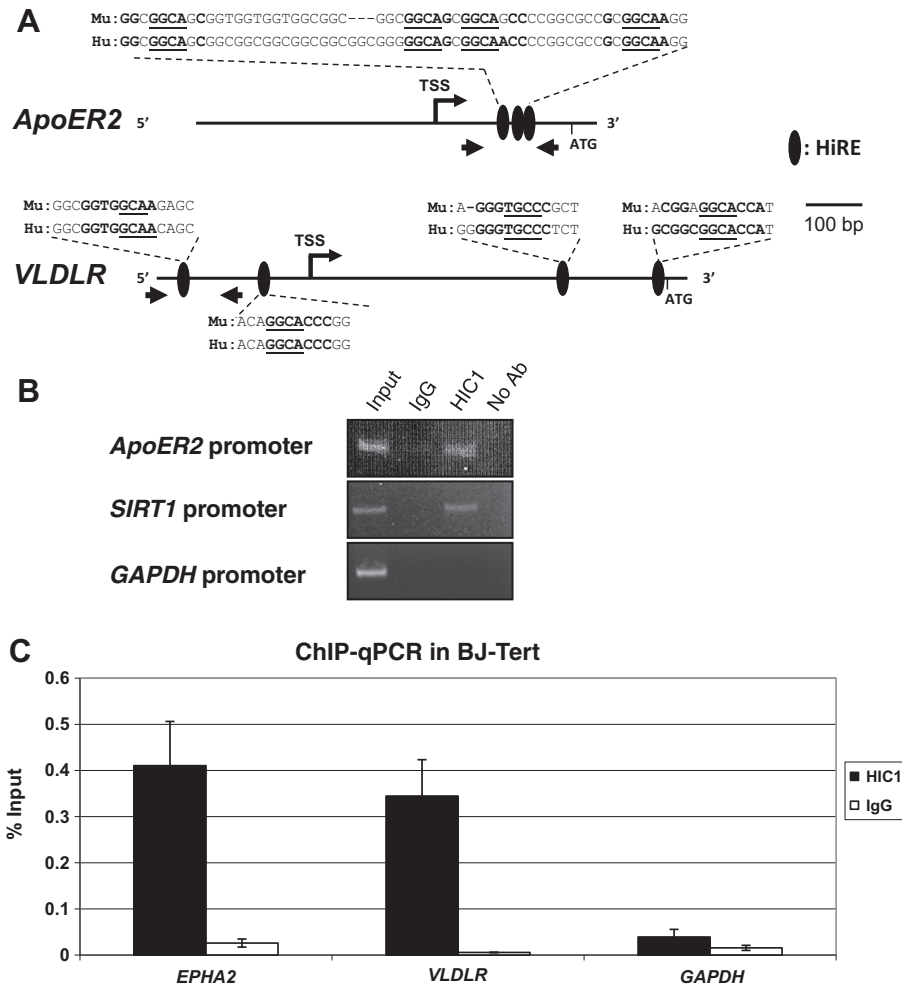


Fig. 3. HIC1 is a direct transcriptional repressor of *ApoER2* and *VLDLR*. (A) Schematic drawing of a part of the 5' region and first coding exon of the human and mouse *ApoER2* and *VLDLR* genes. CLUSTAL analyses identified phylogenetically conserved potential HIC1 binding sites, HiREs. Arrows indicate the position of the primers used in the ChIP experiment. (B) BJ-Tert fibroblast chromatin was immunoprecipitated with anti-HIC1 antibody, as previously described [22]. The bound material was eluted and analyzed by classical PCR using primers flanking the putative HiREs in *ApoER2*. The PCR products were analyzed by agarose gel-electrophoresis. *SIRT1* was used as a positive control and *GAPDH* as an internal non-binding control. (C) Similarly, samples were analyzed by quantitative PCR using primers flanking a putative HiRE in *VLDLR*. *Epha2* was used as positive control and *GAPDH* as an internal non-binding control.

However, the Reelin signaling pathway, and hence these two receptors, is of paramount importance for correct neural cell migration and positioning during early development as demonstrated by the severe phenotypes of knock-out mice and the mutations in these genes associated with human diseases such as lissencephaly and Alzheimer's disease. *HIC1* is located at 17p13.3 within the critical deletion chromosomal region for the Miller–Dieker syndrome combining severe lissencephaly and mental retardation with developmental abnormalities. Lissencephaly is attributed to *LIS1* haploinsufficiency and mouse models have confirmed that *HIC1* is responsible for the severe developmental defects associated with MDS [14]. Indeed, *in situ* hybridization studies have detected *Hic1* expression in the embryonic anlagen of many tissues affected in MDS [25]. Moreover, *Hic1*^{-/-} homozygous mice, obtained through homologous recombination, display various combinations of acrania, exencephaly, omphalocele and limb defects found in MDS patients. By contrast, none of these *Hic1*^{-/-} mice analyzed displayed significant neuronal migration defects or disorganization of the cerebral cortex similar to those observed in graded *Lis1* mutant mice [14]. In addition, *HIC1* is essential for normal cerebellar development through the direct transcriptional repression of the *ATOH1* gene coding for a pro-neuronal transcription factor which controls the migration and differentiation of the proliferative, *ATOH1*⁺/*HIC1*⁻ neuronal precursor cells of the external granule cell

layer (EGL) into non-proliferative, fully differentiated *ATOH1*⁻/*HIC1*⁺ cells of the internal granule cell layer (IGL) [26]. As a consequence, loss of function of *HIC1* is a common feature found in two-thirds of human medulloblastomas and, in mice, inactivation of *Hic1* in the *Ptch1*^{-/+} *Hic1*^{-/+} double heterozygote model increases the incidence of medulloblastoma over that found in the *Ptch1*^{-/+} model [27] [26]. Whereas this EGL differentiation process is mainly controlled by the *Sonic hedgehog* pathway through *ATOH1*, a direct target gene of *HIC1*, Reelin is also expressed in EGL cells which are otherwise negative for *HIC1*.

Besides its well-established function as a direct transcriptional repressor of *ATOH1*, *HIC1* could have another role in the cerebellum outside of neuronal development. Indeed, in addition to strong *Hic1* expression in the IGL and no expression in EGL, a pattern inversely mirroring that of *ATOH1*, immunohistochemistry analyses demonstrate robust *Hic1* expression in the Purkinje cell layer of P15 mouse embryos [26]. Interestingly, each of the Reelin receptors, *ApoER2* and *VLDLR*, direct the dispersal and correct positioning of distinct populations of Purkinje cells (expressing one or both receptors) in the developing cerebellum [28]. Our study demonstrating that *ApoER2* and *VLDLR* are both direct transcriptional targets of *HIC1* could nicely tie together these two set of observations since it suggests that *HIC1* could participate to the regulation of these two receptors in Purkinje cells expression.

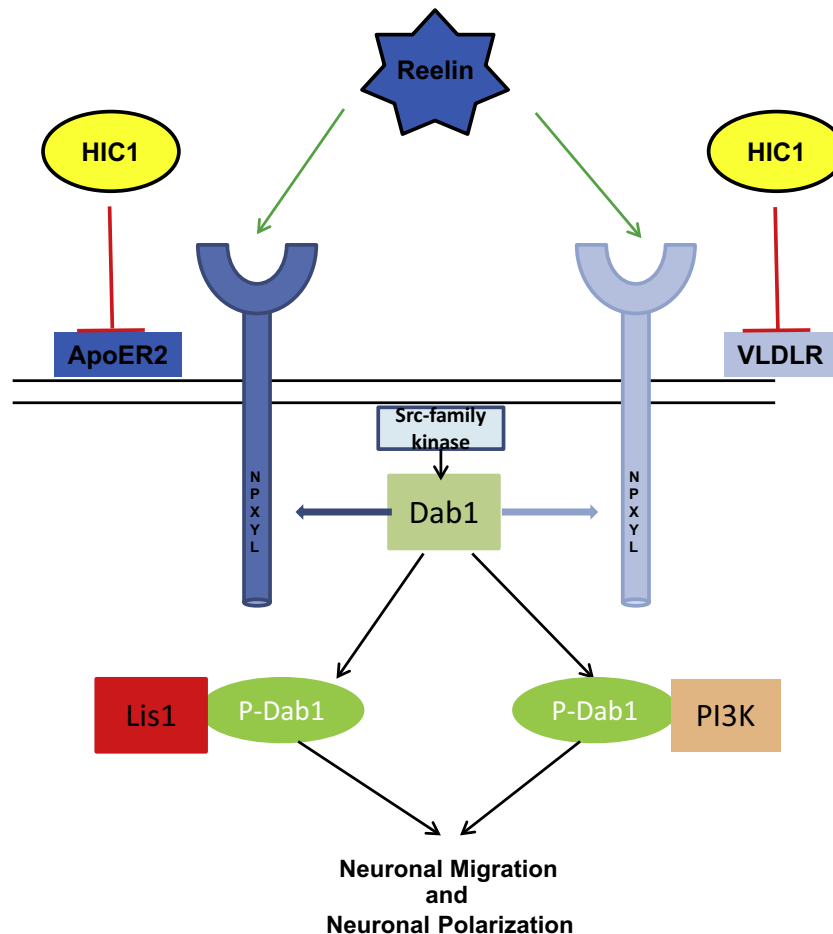


Fig. 4. HIC1 regulates the Reelin pathway through direct transcriptional repression of its canonical receptors ApoER2 and VLDLR. This simplified and schematic drawing of the Reelin pathway is adapted from references [5] and [29].

In conclusion, HIC1 through the direct transcriptional repression of *ATOH1* [26] and of the Reelin receptors *ApoER2* and *VLDLR*, as shown in this study, could be involved in various essential processes of normal cerebellum development.

Acknowledgments

We thank the CNRS, the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC), the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, Comité du Pas de Calais and the Thomas Family Foundation for their financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.091>.

References

- [1] J. Herz, Y. Chen, Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 850–859.
- [2] E. Forster, H.H. Bock, J. Herz, X. Chai, M. Frotscher, S. Zhao, Emerging topics in Reelin function, *Eur. J. Neurosci.* 31 (2010) 1511–1518.
- [3] S.S. Reddy, T.E. Connor, E.J. Weeber, W. Rebeck, Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2, *Mol. Neurodegener.* 6 (2011) 30.
- [4] D.S. Rice, T. Curran, Role of the Reelin signaling pathway in central nervous system development, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 1005–1039.
- [5] Z. Gao, R. Godbout, Reelin-disabled-1 signaling in neuronal migration: splicing takes the stage, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 2319–2329.
- [6] E. Khialeeva, T.F. Lane, E.M. Carpenter, Disruption of Reelin signaling alters mammary gland morphogenesis, *Development* 138 (2011) 767–776.
- [7] T. Stein, E. Cosimo, X. Yu, P.R. Smith, R. Simon, L. Cottrell, M.A. Pringle, A.K. Bell, L. Lattanzio, G. Sauter, C. Lo Nigro, T. Crook, L.M. Machesky, B.A. Gusterson, Loss of Reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 2323–2333.
- [8] T. Chen, F. Wu, F.M. Chen, J. Tian, S. Qu, Variations of very low-density lipoprotein receptor subtype expression in gastrointestinal adenocarcinoma cells with various differentiations, *World J. Gastroenterol.* 11 (2005) 2817–2821.
- [9] L. He, Y. Lu, P. Wang, J. Zhang, C. Yin, S. Qu, Up-regulated expression of type II very low density lipoprotein receptor correlates with cancer metastasis and has a potential link to beta-catenin in different cancers, *BMC Cancer* 10 (2010) 601.
- [10] J. Becker, J. Frohlich, C. Perske, H. Pavlakovic, J. Wilting, Reelin signalling in neuroblastoma: migratory switch in metastatic stages, *Int. J. Oncol.* 41 (2012) 681–689.
- [11] M.M. Wales, M.A. Biel, W. el Deiry, B.D. Nelkin, J.P. Issa, W.K. Cavenee, S.J. Kuerbitz, S.B. Baylin, P53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3, *Nat. Med.* 1 (1995) 570–577.
- [12] B.R. Rood, D. Leprince, Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics, *Expert Opin. Ther. Targets* 17 (2013) 811–827.
- [13] W.Y. Chen, X. Zeng, M.G. Carter, C.N. Morrell, R.W. Chiu Yen, M. Esteller, D.N. Watkins, J.G. Herman, J.L. Mankowski, S.B. Baylin, Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors, *Nat. Genet.* 33 (2003) 197–202.
- [14] M.G. Carter, M.A. Johns, X. Zeng, L. Zhou, M.C. Zink, J.L. Mankowski, D.M. Donovan, S.B. Baylin, Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene Hic1 exhibit developmental defects of structures affected in the Miller–Dieker syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 413–419.
- [15] J. Yingling, K. Toyooka, A. Wynshaw-Boris, Miller–Dieker syndrome: analysis of a human contiguous gene syndrome in the mouse, *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003) 475–488.
- [16] C. Van Rechem, B.R. Rood, M. Touka, S. Pinte, M. Jenal, C. Guerardel, K. Ramsey, D. Monte, A. Begue, M.P. Tschan, D.A. Stephan, D. Leprince, Scavenger

- chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1), *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 20927–20935.
- [17] G. Boulay, N. Malaquin, I. Loison, B. Foveau, C. Van Rechem, B.R. Rood, A. Pourtier, D. Leprince, Loss of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) in breast cancer cells contributes to stress-induced migration and invasion through beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) misregulation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 5379–5389.
- [18] B. Foveau, G. Boulay, S. Pinte, C. Van Rechem, B.R. Rood, D. Leprince, The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 5366–5378.
- [19] W. Zhang, X. Zeng, K.J. Briggs, R. Beaty, B. Simons, R.W. Chiu Yen, M.A. Tyler, H.C. Tsai, Y. Ye, G.S. Gesell, J.G. Herman, S.B. Baylin, D.N. Watkins, A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1, *Oncogene* 29 (2010) 2467–2476.
- [20] V. Dehennaut, I. Loison, M. Dubuissez, J. Nassour, C. Abbadie, D. Leprince, DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 10254–10264.
- [21] V. Dehennaut, I. Loison, G. Boulay, C. Van Rechem, D. Leprince, Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430 (2013) 49–53.
- [22] G. Boulay, M. Dubuissez, C. Van Rechem, A. Forget, K. Helin, O. Ayrault, D. Leprince, Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 10509–10524.
- [23] S. Pinte, N. Stankovic-Valentin, S. Deltour, B.R. Rood, C. Guerardel, D. Leprince, The tumor suppressor gene HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38313–38324.
- [24] W.Y. Chen, D.H. Wang, R.C. Yen, J. Luo, W. Gu, S.B. Baylin, Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses, *Cell* 123 (2005) 437–448.
- [25] C. Grimm, R. Sporle, T.E. Schmid, I.D. Adler, J. Adamski, K. Schughart, J. Graw, Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene Hic1, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller–Dieker syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 697–710.
- [26] K.J. Briggs, I.M. Corcoran-Schwartz, W. Zhang, T. Harcke, W.L. Devereux, S.B. Baylin, C.G. Eberhart, D.N. Watkins, Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma, *Genes Dev.* 22 (2008) 770–785.
- [27] B.R. Rood, H. Zhang, D.M. Weitman, P.H. Cogen, Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma, *Cancer Res.* 62 (2002) 3794–3797.
- [28] M. Larouche, U. Beffert, J. Herz, R. Hawkes, The Reelin receptors Apoer2 and Vldlr coordinate the patterning of Purkinje cell topography in the developing mouse cerebellum, *PLoS ONE* 3 (2008) e1653.
- [29] G. Zhang, A.H. Assadi, R.S. McNeil, U. Beffert, A. Wynshaw-Boris, J. Herz, G.D. Clark, G. D'Arcangelo, The pafah1b complex interacts with the Reelin receptor VLDLR, *PLoS ONE* 2 (2007) e252.

DISCUSSION GENERALE

Mon travail de Thèse a concerné d'une part, la caractérisation des mécanismes transcriptionnels mis en place par HIC1 à travers l'étude et la validation d'un nouveau partenaire protéique, BCL11, en lien avec le recrutement du complexe NuRD et d'autre part, l'identification de nouveaux gènes cibles directs de HIC1. Ces études contribuent à la compréhension des rôles du répresseur transcriptionnel HIC1 afin de mieux appréhender les conséquences de l'extinction de son expression dans les cancers.

Notre équipe a montré que l'interaction entre une région centrale de HIC1 et MTA1 est régulée par des modifications post-traductionnelles (MPTs) : la SUMOylation et l'acétylation (Van Rechem et al., 2010). De la même façon et dans le cadre de la caractérisation de l'interaction entre les protéines BCL11 et les protéines MTA, nous avons mis en évidence que d'une part, le motif N-terminal conservé également dans FOG et SALL1, est nécessaire et suffisant à l'interaction avec les protéines MTA et que d'autre part, la phosphorylation de la Sérine 2 du motif N-terminal conservé de BCL11B empêche l'interaction avec les protéines MTA ; inhibant ainsi le recrutement du complexe NuRD *in vitro*. De plus, nous avons montré que lors d'une réponse immunitaire mimée par l'activation des lymphocytes T CD4⁺ humains, la PKC phosphoryle BCL11B sur la Sérine 2 afin d'inhiber l'interaction avec les protéines MTA pour relarguer le complexe NuRD du promoteur de l'*IL2*. A notre connaissance, il s'agirait de la première description au niveau endogène d'une modification post-traductionnelle ciblant le motif MSRRKQ conservé parmi de nombreux régulateurs du développement hématopoïétique. Puis, la SUMOylation de BCL11B permet le recrutement du coactivateur P300 afin d'activer la transcription de l'*IL2*. En résumé, la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B permet le passage rapide et réversible du rôle répresseur transcriptionnel de BCL11B au rôle activateur transcriptionnel lors d'une réponse immunitaire.

Notre étude est en lien avec la littérature, notamment une étude de 2012 qui a caractérisé les MPTs de Bcl11b au cours du développement des thymocytes murins mimé par l'activation de leur TCR (cf 6.4.4) (Zhang et al., 2012b). Cependant, de nombreuses différences existent entre les deux

études, très vraisemblablement à cause de l'utilisation de systèmes biologiques différents. En effet, dans le cas de la différenciation des thymocytes murins, une cinétique complexe de MPTs incluant des cycles de phosphorylation/déphosphorylation et SUMOylation/déSUMOylation de Bcl11b permettent le passage d'un répresseur à un activateur transcriptionnel par le recrutement du coactivateur P300 au niveau du promoteur de l'*Id2* puis la dégradation de Bcl11b par ubiquitinylation. Ces auteurs (Zhang et al., 2012b) n'ont pas décrit, ni discuté la possibilité d'une phosphorylation de la Sérine 2. Pour des raisons techniques, la phosphorylation de la Sérine 2 de Bcl11b, qui pourrait aussi exister dans ce contexte, ne pouvait pas être détectée lors de leur spectrométrie de masse due à la digestion tryptique utilisée pour préparer les échantillons. En effet, dans ce cas, le motif N-terminal est coupé en un tri-peptide MSR difficilement détectable. D'ailleurs, la partie N-terminale de Bcl11b ne faisait pas partie de la zone de la protéine couverte par leur analyse. Dans leur modèle, ils proposent sur la base d'études de partenaires de Bcl11b par spectrométrie de masse que la protéine Mta2 reste associée avec Bcl11b au niveau du promoteur d'*Id2* lorsque ce dernier recrute P300 pour activer la transcription de l'*Id2* dans les thymocytes. De manière plus précise, lors de l'activation des thymocytes murins, il est observé une augmentation des protéines Bcl11b et Mta2 liées au niveau du promoteur d'*Id2*. En revanche, dans notre cas, nous n'observons pas de variation de fixation de BCL11B au niveau du promoteur d'*IL2* lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ mais une très nette diminution de la quantité de protéines MTA1 liées au promoteur d'*IL2* lors d'expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Il serait très intéressant de déterminer le statut de méthylation/déméthylation de Mta2 associée avec Bcl11b et P300 au niveau du promoteur d'*Id2*. En effet, il a été montré que le statut de méthylation de MTA1 détermine sa fonction corépressive ou coactivatrice (cf 4.5.3) (Nair et al., 2013). Il se pourrait que le même constat soit aussi vrai pour Mta2 et dans ce cas, nous pourrions penser que Bcl11b serait associée à des protéines Mta2 déméthylées agissant en tant que coactivateurs de manière synergique à l'action de P300 pour activer la transcription de l'*Id2* lors du

développement des thymocytes murins. De plus, nos résultats préliminaires – certes par co-immunoprécipitation en cellules HEK293T - indiquent que l'interaction BCL11B-MTA1 diminue légèrement lorsque la déméthylation de MTA1 est favorisée en présence d'une surexpression de LSD1 (cf Figure 44). Ce résultat indique que BCL11B interagit préférentiellement avec les protéines MTA1 dotées de propriétés « corépressives » *in vitro*. Donc, il semblerait que la mise en place de programmes de différenciation qui doivent être stables et pérennes dans la durée alors que dans notre cas il s'agit d'une réponse devant déboucher sur la mise en place très rapide d'une réponse immunitaire conduisent à deux systèmes très différents de régulation de BCL11B. Dans les lymphocytes T CD4⁺ activés, il semble nécessaire d'inhiber de manière dynamique et réversible l'interaction de BCL11B avec MTA1 pour relarguer le complexe NuRD du promoteur d'*IL2* afin d'activer la transcription grâce au recrutement de P300.

De plus, une étude précédente a montré que le motif N-terminal conservé de FOG1 est impliqué à la fois dans l'interaction avec MTA1 et dans l'interaction avec RbAp48. Le motif MSRRK est enfoui dans la structure de RbAp48 ce qui exclut donc la possibilité qu'un seul motif puisse lier à la fois MTA1 et RbAp48.

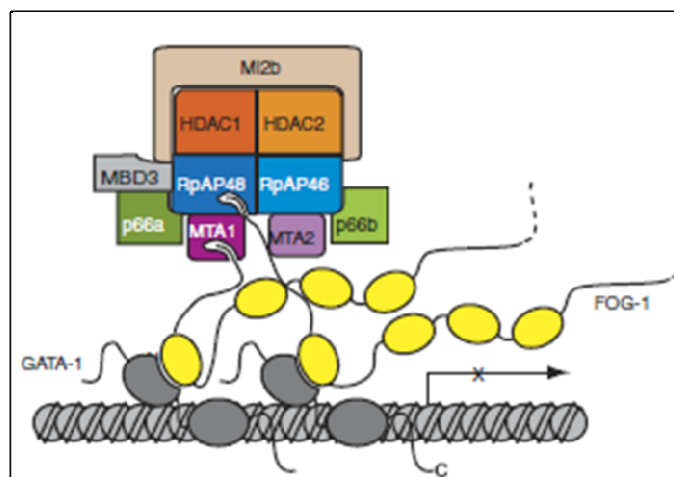


Figure 52 : Modèle du recrutement spécifique du complexe NuRD par GATA1/FOG1 (Lejon et al., 2011)

Le modèle proposé par ces auteurs est donc que 2 protéines FOG1 interagissant avec GATA1 sont nécessaires pour recruter spécifiquement le complexe NuRD via MTA1 et RbAp48 au niveau de 2 sites de fixation de GATA1 sur le promoteur d'un gène cible donné (Figure 52) (Lejon et al., 2011). Dans notre cas et au vu des nouveaux résultats obtenus pour la révision de l'article, le motif N-terminal conservé de BCL11B interagit également avec MTA1 et avec RbAp46 (Figure 53A). Cependant, BCL11B étant probablement capable de s'homodimériser tout comme BCL11A (Liu et al., 2006), un seul site de fixation pour BCL11B serait nécessaire pour recruter spécifiquement le complexe NuRD au niveau du promoteur de l'IL2 (Figure 53A). De plus, nous supposons que la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B empêcherait le recrutement du complexe NuRD en inhibant l'interaction avec les protéines MTA mais aussi l'interaction avec RbAp46 (Figure 53B). En effet dans le cas de FOG, cette Sérine 2 est engagée dans des liaisons hydrogènes alors que les résidus adjacents sont engagés dans des interactions ioniques avec des résidus acides de RbAp48.

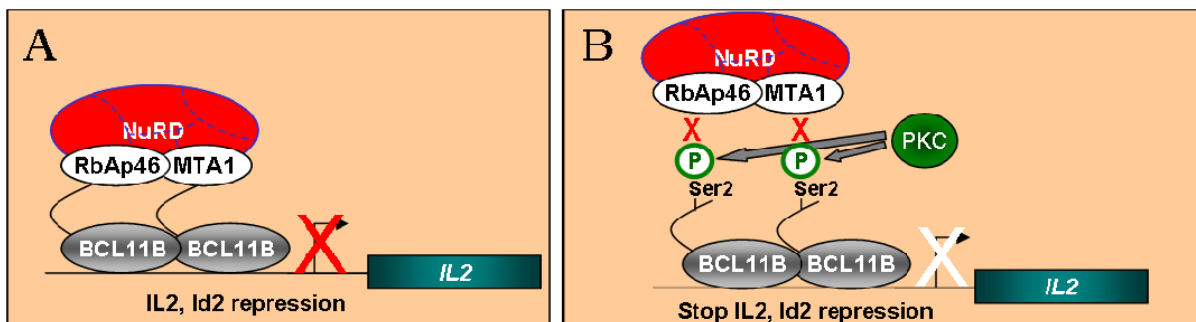


Figure 53 : Modèle proposé pour la régulation du recrutement du complexe NuRD par BCL11B dans les lymphocytes T CD4⁺ non activés (A) et activés (B).

Enfin, en comparaison avec notre modèle, une étude caractérisant la Coronin 1 a montré que la phosphorylation médiée par PKC de la Sérine 2 de la Coronin 1 inhibe son interaction avec le complexe Arp2/3 permettant l'assemblage de l'actine. La Coronin 1 est une protéine impliquée dans la migration, l'endocytose et la formation de jonctions intracellulaires en régulant, en partie l'activité du complexe Arp2/3 (Cai et al., 2005; Oku et al., 2012). Ce résidu de Sérine phosphorylé par PKC est situé dans une

séquence peptidique MSRQ (AA 1-4) ressemblant fortement au site que nous avons identifié dans BCL11B, MSRRKQ (AA 1-6).

De manière plus générale, la régulation du passage d'un répresseur à activateur transcriptionnel par une seule phosphorylation d'un acide aminé donné au sein d'une protéine n'est pas un mécanisme unique à BCL11B. Par exemple, une étude récente a montré que la phosphorylation de la Sérine 473 de KAP1 inhibe le recrutement des corépresseurs G9a et HDAC1 au profit des coactivateurs P300 et LSD1 pour favoriser l'expression des gènes de différenciation musculaire. KAP1 est une protéine impliquée dans la différenciation des myoblastes en myotubes dans les muscles qui agit en tant qu'adaptateur moléculaire du facteur de transcription MyoD pour réguler négativement ou positivement l'expression des gènes cibles de MyoD (Singh et al., 2015).

Dans une deuxième partie de ma Thèse, nous avons caractérisé et validé l'interaction entre HIC1 et les deux paralogues de BCL11, BCL11A et BCL11B. Grâce à un crible double-hybride en levure avec comme appât les domaines de répression transcriptionnelle de HIC1, BTB et RC, plusieurs partenaires protéiques de HIC1 impliqués dans la mise en place de la répression transcriptionnelle au niveau de ses gènes cibles ont été validées :

- ARID1A, la sous-unité non-catalytique du complexe SWI/SNF (cf 5.6.3) (Van Rechem et al., 2009b)
- hPCL3, une sous-unité du complexe PRC2 (cf 5.6.4) (Boulay et al., 2012a)
- MTA1, une sous-unité du complexe corépresseur NuRD (cf 5.6.2) (Van Rechem et al., 2010).

Ce crible a également permis d'isoler l'extrémité C-terminale de BCL11A (cf Publication n°2). Au cours de cette étude, nous avons montré que HIC1 pouvait interagir de manière complexe avec les deux paralogues BCL11A et BCL11B. Deux autres protéines à BTB/POZ sont également capables d'interagir avec les protéines BCL11 : BCL6 et ThPOK (T-helper inducing POZ-Kruppel like factor) (Liu et al., 2006) (Van Rechem C., Thèse de l'Université de Lille, 2009). Nous pouvons supposer que les protéines BCL11 pourraient être des partenaires de nombreuses protéines à domaine BTB/POZ comme KAP1 pour les protéines à domaine KRAB-Zinc Finger mais, dans quel but ?

Pour revenir à notre étude, HIC1 et BCL11B sont toutes deux capables d'interagir avec MTA1 pour recruter le complexe NuRD et interagissent entre elles indépendamment de leur interaction avec MTA1. Ces résultats suggèrent que la formation d'un complexe ternaire HIC1-BCL11B-MTA1 pour réguler de façon synergique leurs gènes cibles communs est envisageable comme il a été montré pour le complexe BCL11A-Sox6-GATA1 régulant le gène de la *γ-globine* dans les cellules érythroïdes adultes humaines (Xu et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs montrent une coopération entre BCL11A, Sox6 et GATA1 pour réprimer de manière synergique le gène de la *γ-globine* : BCL11A et GATA1 recrutent le complexe NuRD via, respectivement MTA2 et FOG1 et, Sox6 interagit avec l'extrémité

C-terminale de BCL11A et avec GATA1. Dans notre cas, des complexes ternaires HIC1-BCL11B-MTA1 permettraient de réguler de façon synergique des gènes cibles communs tels que *p21* ou *p57KIP2* en recrutant de manière stable le complexe NuRD. En effet, nous pourrions imaginer plusieurs scénarios dont voici quelques exemples :

Dans tous les cas, HIC1 et BCL11B, capables de s'homodimériser, sont liées à leur site de fixation de l'ADN respectif et soit :

- interagissent entre elles et recrutent un unique complexe NuRD via MTA1 pour HIC1 et RbAp46 pour BCL11B (Figure 54A)
- n'interagissent pas directement entre elles mais indirectement en interagissant toutes les deux avec une sous-unité d'un unique complexe NuRD : MTA1 pour HIC1 et RbAp46 pour BCL11B (Figure 54B)
- n'interagissent pas directement entre elles et recrutent chacune un complexe NuRD (Figure 54C)
- n'interagissent pas directement entre elles et recrutent chacune un complexe NuRD de manière « croisée », c'est-à-dire MTA1 dans un complexe NuRD et RbAp46 dans l'autre (Figure 54D).

D'autres possibilités existent notamment si nous supposons que HIC1 interagisse non seulement avec MTA1 mais aussi avec RbAp46 pour recruter spécifiquement le complexe NuRD de la même façon que BCL11B.

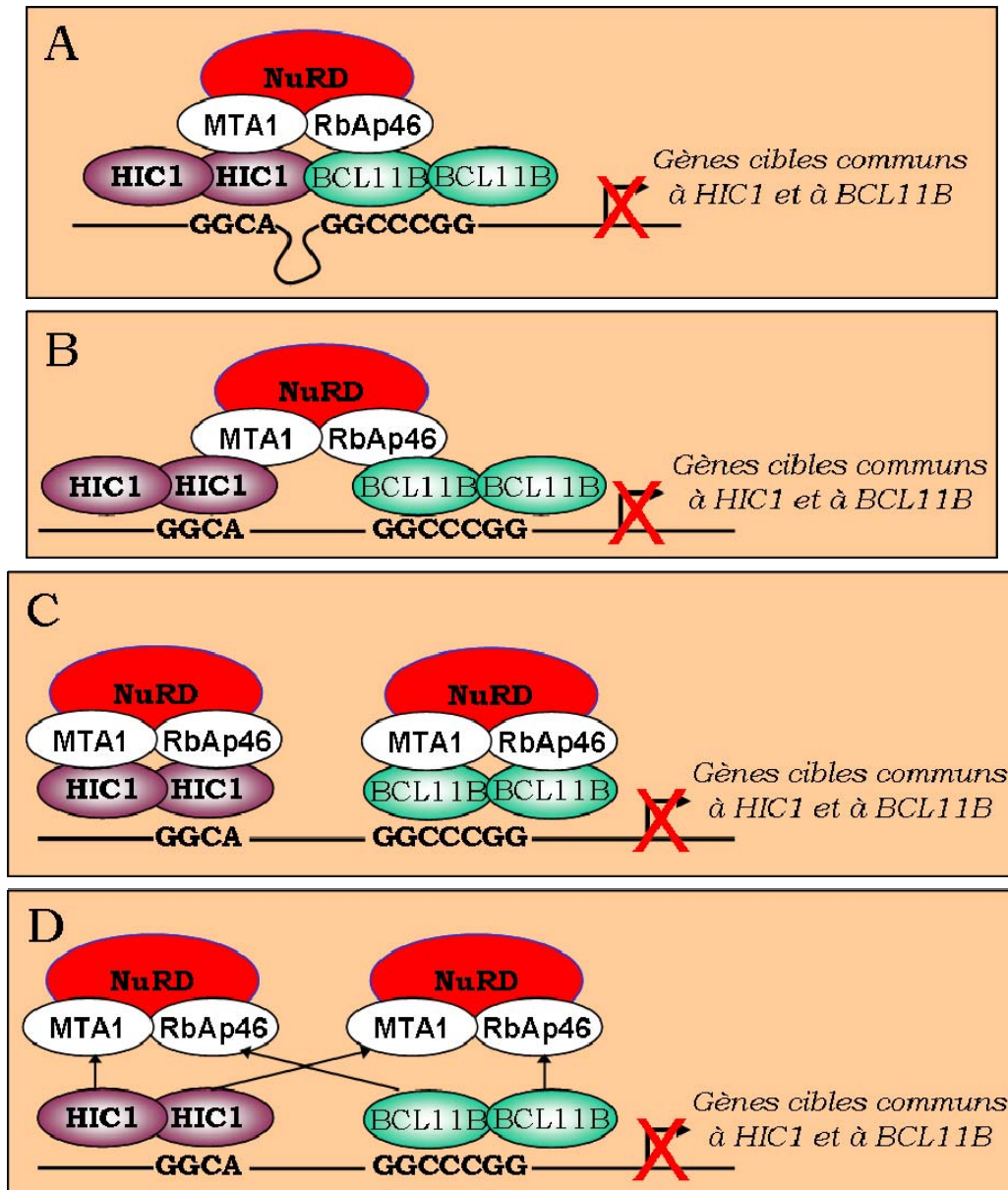


Figure 54 : Répressions transcriptionnelles potentiellement mises en place par HIC1 et BCL11B

Seule une expérience d'immunoprécipitation séquentielle pourra déterminer l'existence d'un complexe ternaire comme illustré sur la figure 54A (cf Publication n°2). Pour les autres hypothèses, il sera techniquement difficile de les valider ou de les infirmer.

Deux autres hypothèses peuvent également expliquer le rôle de l'interaction HIC1-BCL11B : l'interaction entre les protéines endogènes étant localisée majoritairement en dehors de la chromatine, nous pouvons supposer que HIC1 séquestrerait BCL11B dans ses « HIC1 bodies » tout comme TCF4

(Figure 55A) (Valenta et al., 2006) ou empêcherait BCL11B de se fixer sur ses gènes cibles tout comme STAT3 (Figure 55B) (Lin et al., 2013).

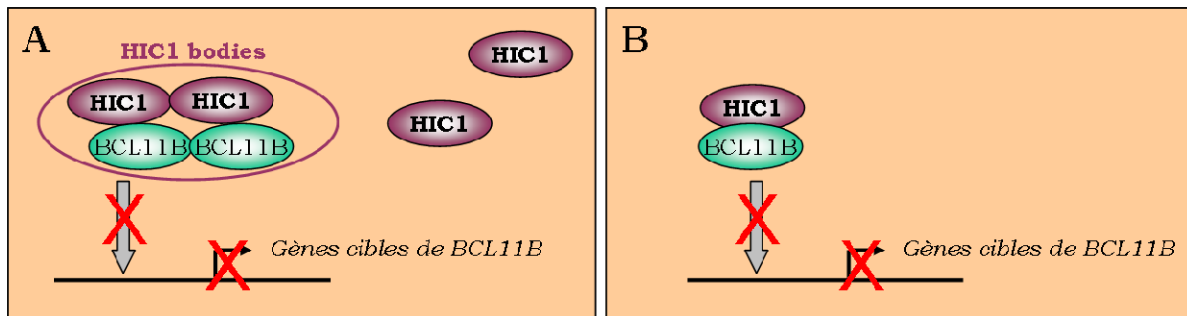


Figure 55 : Autres rôles de l'interaction HIC1-BCL11B

De plus, nous avons montré que l'activation des lymphocytes T CD4⁺ induit l'activation de l'expression de HIC1 (cf Figure 47). Nous pourrions imaginer que dans les lymphocytes T CD4⁺ activés, HIC1 soit exprimée pour :

- réprimer ses gènes cibles directs dont *SDF1* (cf Figure 50) et peut-être *BCL11B* lui-même (Figure 56). En effet, nous avons observé une répression transcriptionnelle de *BCL11B* (cf Publication n°1) et une augmentation de l'expression de HIC1 lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Or, HIC1 étant un répresseur transcriptionnel, il serait intéressant de déterminer si HIC1 peut réprimer directement ou indirectement l'expression de *BCL11B* dans les lymphocytes T CD4⁺ activés dans le cadre d'une boucle de régulation.

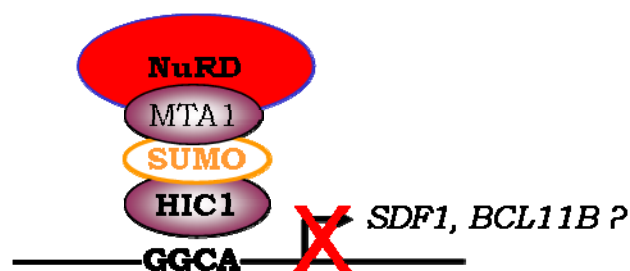


Figure 56 : HIC1 réprime *SDF1* et, peut-être *BCL11B* dans les lymphocytes T CD4⁺ activés

- interagir avec BCL11B pour réprimer de manière synergique l'expression de gènes cibles communs à HIC1 et à BCL11B en recrutant stablement le complexe NuRD (cf Figure 54)
- interagir avec BCL11B pour le séquestrer afin de stopper son activité (cf Figure 55).

Par exemple, HIC1 réprime l'expression de SIRT1 et interagit avec SIRT1 pour réprimer la transcription (Chen et al., 2005) et pour favoriser sa SUMOylation en induisant sa désacétylation (Stankovic-Valentin et al., 2007).

Une perspective à très court terme serait d'étudier l'interaction entre les protéines HIC1 et BCL11B endogènes par une expérience de Co-IP dans les fractions nucléoplasmiques/cytoplasmiques et chromatiniennes des lymphocytes T CD4⁺ activés.

A plus long terme, des expériences de ChIP-Seq avec des anticorps dirigés contre HIC1, BCL11B et MTA1 permettraient suite à un croisement de listes des gènes cibles de déterminer si d'autres gènes cibles communs à ces trois protéines en plus de *p57* et de *p21* existent et quel(s) serai(en)t le(s) rôle(s) de la formation de ces potentiels complexes ternaires HIC1-BCL11B-MTA1 dans la régulation de ces gènes communs lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ ?

En résumé, le point commun entre ces deux parties de ma Thèse est la famille des protéines MTA. Ces protéines permettent à différents facteurs de transcription de recruter spécifiquement le complexe NuRD au niveau de leurs gènes cibles. En effet de courts motifs peptidiques au sein de ces régulateurs transcriptionnels interagissent avec les protéines MTA et des MPTs au niveau de ces courts motifs peptidiques régulent ces interactions : dans le cas de HIC1, un motif peptidique localisé dans sa région centrale est impliqué dans l'interaction avec l'extrémité C-terminale de MTA1, la SUMOylation de ce motif favorise l'interaction tandis que l'acétylation l'inhibe (Van Rechem et al., 2010). En comparaison avec la littérature, il s'avère que le facteur de transcription BCL6 recrute le complexe NuRD en interagissant avec l'extrémité C-terminale de MTA3 (Fujita et al., 2004b). De plus, de même que pour HIC1, un motif peptidique de séquence KKYK³⁷⁹ localisé dans sa région centrale est impliqué dans l'interaction avec MTA3 et l'acétylation de ce motif inhibe l'interaction (Bereshchenko et al., 2002). L'activité de répression transcriptionnelle de HIC1 et de BCL6 médiée par le complexe NuRD est donc en partie régulée par des MPTs ciblant une lysine d'un motif peptidique présent dans leur région centrale (Figure 57).

Contrairement à HIC1 et BCL6 qui possèdent des motifs peptidiques uniques d'interactions avec, respectivement, les protéines MTA1 et MTA3, les protéines BCL11 appartiennent à une famille de cofacteurs dont FOG et SALL1, caractérisée par un motif N-terminal conservé de séquence MSRRKQ impliqué dans la répression transcriptionnelle (Lin et al., 2004). Nous avons montré que le motif N-terminal conservé est impliqué dans l'interaction avec toutes les protéines MTA et que la phosphorylation de la Sérine 2 inhibe ces interactions (Figure 57) (Publication n°1).

En résumé, les MPTs des facteurs de transcription décrites ci-dessus permettent de réguler de façon fine, dynamique et réversible le recrutement du complexe NuRD en favorisant ou inhibant l'interaction avec les protéines MTA et probablement avec RbAp46/48 (cf Figure 52 et Figure 53)(Lejon et al., 2011). En effet, dans le cadre de dommages à l'ADN non réparables, la SUMOylation de HIC1 est favorisée ce qui promeut l'interaction avec MTA1 (Publication n°5 (Dehennaut et al., 2013b)). En revanche, lors de la

différenciation des lymphocytes B au sein du centre germinatif, l'acétylation de BCL6 inhibe le recrutement du complexe NuRD (Bereshchenko et al., 2002) de même que lors d'une réponse immunitaire, la phosphorylation de la Sérine 2 de BCL11B inhibe le recrutement du complexe NuRD (Publication n°1). De plus, pour complexifier un peu plus ce modèle, HIC1 et BCL6 (Expériences de Co-IP en HEK293T, Résultats non montrés) interagissent toutes deux avec les protéines BCL11A et BCL11B et recrutent toutes le complexe NuRD. Les protéines BCL11 pourraient jouer le rôle d'adaptateur moléculaire « général » des protéines à BTB/POZ permettant de recruter spécifiquement et stablement le complexe NuRD sur des gènes cibles communs. Par exemple, dans le cadre de dommages à l'ADN non réparables, les interactions de HIC1 avec MTA1 (Publication n°5 (Dehennaut et al., 2013b)) et avec BCL11B (Publication n°2) sont favorisées. Ces résultats pourraient suggérer que HIC1 recruterait le complexe NuRD directement et indirectement via BCL11B pour « verrouiller » la répression transcriptionnelle mise en place en cas de dommages à l'ADN non réparables. En effet, il faudrait à la fois acétyler HIC1 et phosphoryler BCL11B pour inhiber leurs interactions avec les protéines MTA afin de relarguer le complexe NuRD.

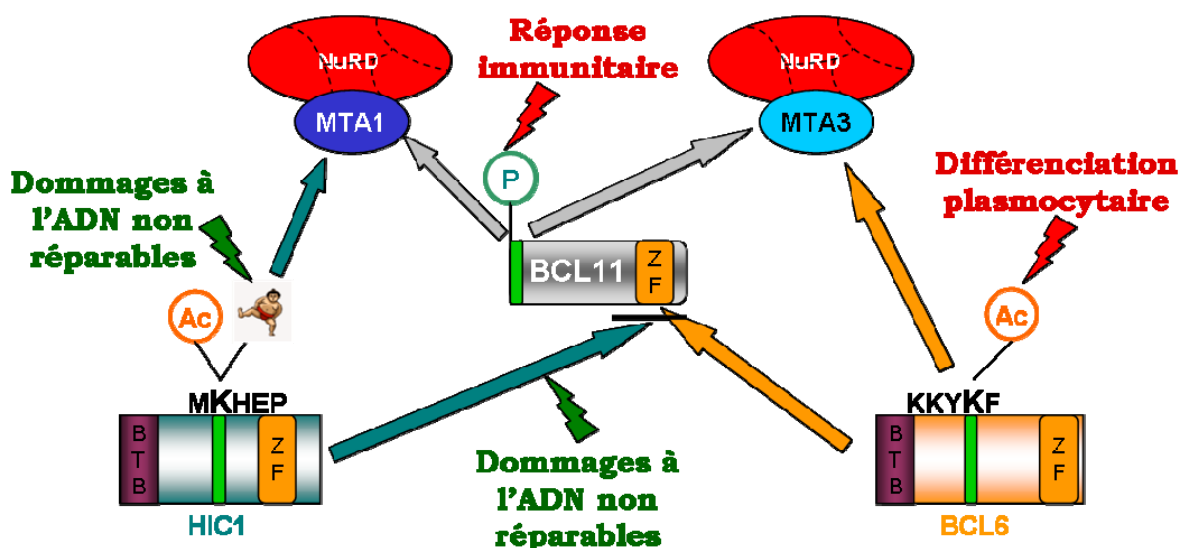


Figure 57 : Modalités d'interactions entre les protéines HIC1, BCL6 et BCL11 en lien avec le complexe NuRD

De manière intéressante, l'extrémité C-terminale des protéines MTA est complètement désorganisée. Or, elle permet d'une part, la formation du complexe NuRD et d'autre part, le recrutement de ce complexe NuRD par de nombreux facteurs de transcription (Alqarni et al., 2014; Lejon et al., 2011).

De plus, une étude récente a montré que l'interaction entre l'extrémité C-terminale de MTA1 et RbAp48 est nécessaire à la formation du complexe NuRD. De manière plus précise, un motif peptidique de séquence KRAAR localisé dans la région C-terminale de MTA1 et conservé parmi les protéines MTA est impliqué dans l'interaction avec RbAp48 (cf Figure 14). D'après une prédiction structurale, ce motif de MTA1 adopterait une structure hélicoïdale lorsqu'il interagit avec RbAp48. De plus, un excès du peptide N-terminal de FOG (1-15) comprenant le motif conservé n'influence pas l'interaction entre MTA1 et RbAp48. Ce résultat suggère que FOG interagit avec MTA1 et avec RbAp48 indépendamment de leur interaction (Alqarni et al., 2014).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée pour définir la structure de l'extrémité C-terminale de MTA1 en présence de peptides de régulateurs transcriptionnels interagissant avec MTA1. Par exemple, il serait très intéressant de déterminer par des expériences de cristallographie et/ou de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), la conformation structurale de la région C-terminale de MTA1 en absence et en présence de peptides comprenant soit la région centrale de HIC1, soit le motif N-terminal conservé de BCL11 ou les deux. Nous pourrions très bien imaginer que les domaines de l'extrémité C-terminale de MTA1 se structurent en formant des poches d'interactions avec HIC1 et/ou BCL11.

D'autres partenaires protéiques sont également communs à HIC1 et à BCL11B tels que la déméthylase LSD1 et le facteur de transcription ThPok.

Dans le cas de LSD1, notre équipe a montré que HIC1 est capable d'interagir avec LSD1 indépendamment de son interaction avec MTA1 (Boulay G., Thèse de l'Université de Lille, 2011). Il s'avère que BCL11B interagit également avec LSD1 pour réprimer la transcription du VIH (Le Douce et al., 2012). De plus, LSD1 est responsable, en partie de la déméthylation de MTA1 (Nair et al., 2013) et nous avons montré que les

interactions HIC1-MTA1 et BCL11B-MTA1 diminuent lorsque LSD1 est surexprimée *in vitro* (cf Figure 41 et Figure 44). Ces résultats suggèrent que les interactions entre HIC1, BCL11B et soit MTA1, soit LSD1, seraient indépendantes. A contrario, dans certains cas, LSD1 est présent au sein même du complexe NuRD (Wang et al., 2009). Mais, les interactions de HIC1 et de BCL11B avec MTA1 étant défavorisées en présence de LSD1, l'hypothèse selon laquelle HIC1 et BCL11B interagiraient avec LSD1 lorsqu'elles recrutent le complexe NuRD n'est pas favorisée. Un des rôles plausibles de l'interaction avec LSD1 serait de recruter d'autres méthyltransférases comme dans le cadre du VIH (cf 6.3.5 (Le Douce et al., 2012)) pour la mise en place de la répression transcriptionnelle ou comme dans le cas de BCL11A régulant l'expression de l'HbF (cf 6.3.2 (Xu et al., 2013)), pour maintenir la répression transcriptionnelle d'un gène donné.

En ce qui concerne ThPOK, cette protéine à domaine BTB/POZ est impliquée dans la différenciation des thymocytes au stade SP en CD4⁺ (cf Figure 30). ThPOK a également été isolée lors de notre crible double-hybride en levure décrit précédemment. Notre équipe a montré que les protéines HIC1 et BCL11B sont toutes deux capables d'interagir avec ThPOK *in vitro* (Van Rechem C., Thèse de l'Université de Lille, 2009). De plus, les patrons d'expression de HIC1 et de BCL11B au cours du développement embryonnaire chez la souris suggèrent une co-expression forte au niveau du thymus (Grimm et al., 1999; Leid et al., 2004). Une perspective à long terme serait d'étudier le(s) rôle(s) des interactions entre ces trois facteurs de transcription HIC1, BCL11B et ThPOK au cours du développement des lymphocytes T.

Enfin, une dernière partie de ma Thèse a permis d'enrichir la liste des gènes cibles directs de HIC1 en identifiant quatre nouveaux gènes cibles dont trois codent des récepteurs membranaires et le dernier code la chimiokine CXCL12/SDF1.

Au début de l'étude concernant le répresseur transcriptionnel HIC1, *SIRT1* fut identifié comme le premier gène cible direct de HIC1 montrant un rôle de HIC1 dans l'induction de l'apoptose via l'activation de P53. En effet, en réponse à des dommages à l'ADN non réparables, HIC1 réprime l'expression de *SIRT1* ce qui promeut l'activation de P53 n'étant plus désacétylée par SIRT1 (cf 5.7.2). Jusqu'à ce jour, plusieurs études de l'équipe ont identifié de nombreux gènes cibles de HIC1 codant des récepteurs membranaires tels que CXCR7, ADRB2 et EphA2 (cf 5.6) impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire. Mes travaux de Thèse enrichissent cette liste de gènes cibles avec d'abord, les gènes *ApoER2* et *VLDLR* impliqués dans le développement embryonnaire (cf Publication n°3 (Dubuissez et al., 2013)) et puis, en collaboration avec le Dr Korinek, le gène *TLR2* impliqué dans la prolifération cellulaire (cf Publication n°6 (Janeckova et al., 2015)). En ce qui concerne les gènes *ApoER2* et *VLDLR* codant tous deux des récepteurs avec pour ligand commun la Reelin, ceux-ci associés à *ATOH1* confortent le rôle de HIC1 dans le développement du cervelet. Quand à *TLR2*, il code un récepteur capable de détecter des agents pathogènes et d'initier une réponse immunitaire. Ce dernier ajoute un nouveau rôle de HIC1 jusqu'alors inconnu dans la réponse immunitaire.

En résumé, ces trois nouveaux gènes cibles codant des récepteurs membranaires, suggèrent un rôle important de HIC1 dans la régulation transcriptionnelle de protéines membranaires essentielles pour la cellule. En effet, ces protéines localisées à la surface membranaire des cellules permettent de détecter de façon spécifique des molécules pour induire une cascade de signalisation aboutissant à une réponse spécifique telle que la prolifération cellulaire dans le cas des facteurs de croissance. Donc, la perte d'expression de HIC1 dans les cellules conduit à une surexpression de ces « senseurs » moléculaires menant à la dérégulation complète de voies de

signalisation impliquées dans la migration et dans l'invasion favorisant la tumorigénèse.

De manière intéressante, notre dernier gène cible identifié code pour la chimiokine CXCL12/SDF1 qui est le ligand commun aux récepteurs CXCR4 et CXCR7, précédemment caractérisé comme gène cible direct de HIC1 (Van Rechem et al., 2009a). De plus, nous avons caractérisé *CXCL12/SDF1* comme nouveau gène cible direct de HIC1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés (cf Figure 50). La chimiokine CXCL12 se fixant sur le récepteur CXCR4, joue un rôle important dans la migration des cellules de l'immunité vers les sites d'inflammation. De plus, nous avons observé que l'expression de *CXCR4* diminue dans les lymphocytes T CD4⁺ activés de la même façon que l'expression de *SDF1* et de *CXCR7* (cf Figure 49), tous deux gènes cibles directs de HIC1 (cf Figure 50) (Van Rechem et al., 2009a). Nous pouvons donc penser que *CXCR4* pourrait être également un gène cible direct de HIC1. Dans ce cas, HIC1 régulerait la voie complète CXCL12/CXCR4-CXCR7 impliquée dans le « homing » des cellules immunitaires en cas d'infection. De manière similaire, des études précédentes ont montré que HIC1 régulait la voie de signalisation Eph : le ligand EFNA1 (Zhang et al., 2010) et son récepteur EphA2 (Foveau et al., 2012). Il semblerait donc que HIC1 pourrait réguler des voies de signalisations complètes en réprimant l'expression synergique du couple ligand-récepteur.

Pour revenir à notre nouveau gène cible de HIC1, CXCL12 est également connu sous le nom de SDF1 pour Stromal cell Derived Factor 1. SDF1 est l'acteur essentiel du dialogue entre le stroma et les cellules épithéliales dans les cancers comme par exemple dans les tumeurs prostatiques. De plus, la voie de signalisation SDF1-CXCR4 participerait à la dissémination des tumeurs solides. Récemment, une étude a montré que l'axe CXCL12-CXCR4 est essentiel à la maintenance et à la progression des leucémies aiguës à lymphocytes T (Pitt et al., 2015). De manière plus précise, les cellules endothéliales vasculaires sécrètent la chimiokine CXCL12 qui en se fixant sur les récepteurs CXCR4 présents à la membrane des lymphocytes T transformés, favorise leur prolifération. Donc la régulation de la voie CXCL12/SDF1-CXCR7 par HIC1 ajoute une nouvelle dimension des gènes

réprimés par ce dernier qui est la régulation de gènes impliqués dans le « homing » des cellules de l'immunité. Afin d'appréhender l'importance de ce nouveau rôle de HIC1 dans la réponse immunitaire, il serait nécessaire de réaliser un CHIP-Seq pour identifier tous les gènes cibles directs de HIC1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés.

De manière générale, mon projet de Thèse de départ était l'étude d'interactions entre des facteurs de transcription, HIC1 et BCL11, et des corépresseurs transcriptionnels, MTA pour la mise en place de la répression transcriptionnelle au niveau de leurs gènes cibles. Finalement, cette étude nous a menés vers un nouveau rôle de HIC1 jusqu'alors inconnu dans la mise en place de la réponse immunitaire. De plus, l'étude approfondie des malformations observées chez les souris *Hic* ^{-/-} indique un défaut de développement du thymus avec une population de thymocytes anormalement faible (Carter M., PhD Thesis, The Johns Hopkins University, Baltimore, 2000). Ces observations ainsi que mes résultats de Thèse suggèrent donc un rôle important de HIC1 dans le développement du système immunitaire, notamment dans la formation du thymus, ainsi que dans la mise en place de la réponse immunitaire. Il serait très intéressant de poursuivre l'étude de ce nouveau rôle de HIC1 à plus long terme.

BIBLIOGRAPHIE

Albu, D.I., Feng, D., Bhattacharya, D., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Liu, P., and Avram, D. (2007). BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *J. Exp. Med.* 204, 3003–3015.

Allen, H.F., Wade, P.A., and Kutateladze, T.G. (2013). The NuRD architecture. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*

Alqarni, S.S.M., Murthy, A., Zhang, W., Przewloka, M.R., Silva, A.P.G., Watson, A.A., Lejon, S., Pei, X.Y., Smits, A.H., Kloet, S.L., et al. (2014). Insight into the architecture of the NuRD complex: structure of the RbAp48-MTA1 subcomplex. *J. Biol. Chem.* 289, 21844–21855.

Amaya, M., Desai, M., Gnanapragasam, M.N., Wang, S.Z., Zu Zhu, S., Williams, D.C., and Ginder, G.D. (2013). Mi2 β -mediated silencing of the fetal γ -globin gene in adult erythroid cells. *Blood* 121, 3493–3501.

Aramaki, Y., Ogawa, K., Toh, Y., Ito, T., Akimitsu, N., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Matsusue, K., Kono, A., Iguchi, H., et al. (2005). Direct interaction between metastasis-associated protein 1 and endophilin 3. *FEBS Lett.* 579, 3731–3736.

Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J.D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207–221.

Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Jabaudon, D., Yoshida, Y., and Macklis, J.D. (2008). Ctip2 controls the differentiation of medium spiny neurons and the establishment of the cellular architecture of the striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 622–632.

Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D.J., Ishmael, J.E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 10315–10322.

Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A., and Leid, M. (2002). COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem. J.* 368, 555–563.

Ayrapetov, M.K., Xu, C., Sun, Y., Zhu, K., Parmar, K., D'Andrea, A.D., and Price, B.D. (2011). Activation of Hif1 α by the prolylhydroxylase inhibitor dimethoxymethylglycine decreases radiosensitivity. *PLoS One* 6, e26064.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* 11, 726–734.

Bereshchenko, O.R., Gu, W., and Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat. Genet.* 32, 606–613.

Bernard, O.A., Busson-LeConiat, M., Ballerini, P., Mauchauffé, M., Della Valle, V., Monni, R., Nguyen Khac, F., Mercher, T., Penard-Lacronique,

V., Pasturaud, P., et al. (2001). A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 15, 1495–1504.

Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326.

Bottardi, S., Mavoungou, L., Pak, H., Daou, S., Bourgoïn, V., Lakehal, Y.A., Affar, E.B., and Milot, E. (2014). The IKAROS interaction with a complex including chromatin remodeling and transcription elongation activities is required for hematopoiesis. *PLoS Genet.* 10, e1004827.

Boulay, G., Rosnoblet, C., Guérardel, C., Angrand, P.-O., and Leprince, D. (2011). Functional characterization of human Polycomb-like 3 isoforms identifies them as components of distinct EZH2 protein complexes. *Biochem. J.* 434, 333–342.

Boulay, G., Dubuissez, M., Van Rechem, C., Forget, A., Helin, K., Ayrault, O., and Leprince, D. (2012a). Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *J. Biol. Chem.* 287, 10509–10524.

Boulay, G., Malaquin, N., Loison, I., Foveau, B., Van Rechem, C., Rood, B.R., Pourtier, A., and Leprince, D. (2012b). Loss of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) in breast cancer cells contributes to stress-induced migration and invasion through β -2 adrenergic receptor (ADRB2) misregulation. *J. Biol. Chem.* 287, 5379–5389.

Brackertz, M., Boeke, J., Zhang, R., and Renkawitz, R. (2002). Two highly related p66 proteins comprise a new family of potent transcriptional repressors interacting with MBD2 and MBD3. *J. Biol. Chem.* 277, 40958–40966.

Brackertz, M., Gong, Z., Leers, J., and Renkawitz, R. (2006). p66alpha and p66beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction. *Nucleic Acids Res.* 34, 397–406.

Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24, 336–346.

Brieger, J., Mann, S.A., Pongsapich, W., Koutsimpelas, D., Fruth, K., and Mann, W.J. (2012). Pharmacological genome demethylation increases radiosensitivity of head and neck squamous carcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 29, 505–509.

Briggs, K.J., Corcoran-Schwartz, I.M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W.L., Baylin, S.B., Eberhart, C.G., and Watkins, D.N. (2008). Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev.* 22, 770–785.

Briones, V.R., Chen, S., Riegel, A.T., and Lechleider, R.J. (2006). Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 595–601.

Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T.J., Tschan, M.P., Hügli, B., Reddy, V.A., Andres, A.-C., Torbett, B.E., Tobler, A., and Fey, M.F. (2006). Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* 25, 2030–2039.

Cai, L., Holoweckyj, N., Schaller, M.D., and Bear, J.E. (2005). Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J. Biol. Chem.* 280, 31913–31923.

Cardoso, C., Leventer, R.J., Ward, H.L., Toyo-Oka, K., Chung, J., Gross, A., Martin, C.L., Allanson, J., Pilz, D.T., Olney, A.H., et al. (2003). Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 918–930.

Carter, M.G., Johns, M.A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M.C., Mankowski, J.L., Donovan, D.M., and Baylin, S.B. (2000). Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9, 413–419.

Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z., and Li, E. (2003a). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by *Dnmt3a* and *Dnmt3b*. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5594–5605.

Chen, W., Cooper, T.K., Zahnow, C.A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J.E., Gokgoz, N., Wunder, J.S., Andrulis, I.L., et al. (2004). Epigenetic and genetic loss of *Hic1* function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 387–398.

Chen, W.Y., Zeng, X., Carter, M.G., Morrell, C.N., Chiu Yen, R.-W., Esteller, M., Watkins, D.N., Herman, J.G., Mankowski, J.L., and Baylin, S.B. (2003b). Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat. Genet.* 33, 197–202.

Chen, W.Y., Wang, D.H., Yen, R.C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S.B. (2005). Tumor suppressor *HIC1* directly regulates *SIRT1* to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123, 437–448.

Cherrier, T., Suzanne, S., Redel, L., Calao, M., Marban, C., Samah, B., Mukerjee, R., Schwartz, C., Gras, G., Sawaya, B.E., et al. (2009). p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* 28, 3380–3389.

Cherrier, T., Le Douce, V., Eilebrecht, S., Riclet, R., Marban, C., Dequiedt, F., Goumon, Y., Paillart, J.-C., Mericskay, M., Parlakian, A., et al. (2013). CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12655–12660.

Chinnadurai, G. (2007). Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1593–1607.

Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18475–18480.

Cismasiu, V.B., Adamo, K., Gecewicz, J., Duque, J., Lin, Q., and Avram, D. (2005). BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* *24*, 6753–6764.

Cismasiu, V.B., Ghanta, S., Duque, J., Albu, D.I., Chen, H.-M., Kasturi, R., and Avram, D. (2006). BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4+ T lymphocytes. *Blood* *108*, 2695–2702.

Cismasiu, V.B., Paskaleva, E., Suman Daya, S., Canki, M., Duus, K., and Avram, D. (2008). BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* *380*, 173–181.

Cismasiu, V.B., Duque, J., Paskaleva, E., Califano, D., Ghanta, S., Young, H.A., and Avram, D. (2009). BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF-kappaB activation through up-regulation of Cot kinase gene expression in T-lymphocytes. *Biochem. J.* *417*, 457–466.

Cohen, P., Holmes, C.F., and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 98–102.

Cong, L., Pakala, S.B., Ohshiro, K., Li, D.-Q., and Kumar, R. (2011). SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function. *J. Biol. Chem.* *286*, 43793–43808.

Cui, Y., Niu, A., Pestell, R., Kumar, R., Curran, E.M., Liu, Y., and Fuqua, S.A.W. (2006). Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor alpha whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *20*, 2020–2035.

Dehennaut, V., Loison, I., Pinte, S., and Leprince, D. (2012). Molecular dissection of the interaction between HIC1 and SIRT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 384–388.

Dehennaut, V., Loison, I., Boulay, G., Van Rechem, C., and Leprince, D. (2013a). Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 49–53.

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

Dehennaut, V., Leprince, D., and Lefebvre, T. (2014). O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front. Endocrinol.* *5*, 155.

Deltour, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (1999). Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and gammaFBP-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14831–14836.

Deltour, S., Pinte, S., Guérardel, C., and Leprince, D. (2001). Characterization of HRG22, a human homologue of the putative tumor suppressor gene HIC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 427–434.

Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, B., and Leprince, D. (2002). The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4890–4901.

Denslow, S.A., and Wade, P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* *26*, 5433–5438.

Desai, M.A., Webb, H.D., Sinanan, L.M., Scarsdale, J.N., Walavalkar, N.M., Ginder, G.D., and Williams, D.C. (2015). An intrinsically disordered region of methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) recruits the histone deacetylase core of the NuRD complex. *Nucleic Acids Res.*

Van Dessel, N., Beke, L., Görnemann, J., Minnebo, N., Beullens, M., Tanuma, N., Shima, H., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2010). The phosphatase interactor NIPP1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets. *Nucleic Acids Res.* *38*, 7500–7512.

Dhar, S., Kumar, A., Li, K., Tzivion, G., and Levenson, A.S. (2015). Resveratrol regulates PTEN/Akt pathway through inhibition of MTA1/HDAC unit of the NuRD complex in prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1853*, 265–275.

Di Croce, and Helin, K. (2013). Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 1147–1155.

Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2012). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1904–1915.

Dubuissez, M., Faiderbe, P., Pinte, S., Dehennaut, V., Rood, B.R., and Leprince, D. (2013). The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *440*, 424–430.

Eilebrecht, S., Le Douce, V., Riclet, R., Targat, B., Hallay, H., Van Driessche, B., Schwartz, C., Robette, G., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2014). HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4962–4971.

Enomoto, T., Ohmoto, M., Iwata, T., Uno, A., Saitou, M., Yamaguchi, T., Kominami, R., Matsumoto, I., and Hirota, J. (2011). Bcl11b/Ctip2 controls the differentiation of vomeronasal sensory neurons in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 10159–10173.

- Fabbri, M., and Calin, G.A. (2010). Epigenetics and miRNAs in human cancer. *Adv. Genet.* *70*, 87–99.
- Flanagan, J.F., Mi, L.-Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* *438*, 1181–1185.
- Fleuriel, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B.R., and Leprince, D. (2009). HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 26–33.
- Foveau, B., Boulay, G., Pinte, S., Van Rechem, C., Rood, B.R., and Leprince, D. (2012). The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *J. Biol. Chem.* *287*, 5366–5378.
- Friedman, J.M., Liang, G., Liu, C.-C., Wolff, E.M., Tsai, Y.C., Ye, W., Zhou, X., and Jones, P.A. (2009). The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res.* *69*, 2623–2629.
- Fujii, H., Biel, M.A., Zhou, W., Weitzman, S.A., Baylin, S.B., and Gabrielson, E. (1998). Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene* *16*, 2159–2164.
- Fujita, N., Jaye, D.L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C.S., and Wade, P.A. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* *113*, 207–219.
- Fujita, N., Kajita, M., Taysavang, P., and Wade, P.A. (2004a). Hormonal regulation of metastasis-associated protein 3 transcription in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *18*, 2937–2949.
- Fujita, N., Jaye, D.L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M.R., Boss, J.M., and Wade, P.A. (2004b). MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* *119*, 75–86.
- Gao, Y., WU, H., HE, D., HU, X., and LI, Y. (2013). Downregulation of BCL11A by siRNA induces apoptosis in B lymphoma cell lines. *Biomed. Rep.* *1*, 47–52.
- Gnanapragasam, M.N., Scarsdale, J.N., Amaya, M.L., Webb, H.D., Desai, M.A., Walavalkar, N.M., Wang, S.Z., Zu Zhu, S., Ginder, G.D., and Williams, D.C. (2011). p66Alpha-MBD2 coiled-coil interaction and recruitment of Mi-2 are critical for globin gene silencing by the MBD2-NuRD complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7487–7492.
- Go, R., Hirose, S., Morita, S., Yamamoto, T., Katsuragi, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. (2010). Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in gamma-irradiated mice. *Cancer Sci.* *101*, 1347–1353.
- Go, R., Hirose, S., Katsuragi, Y., Obata, M., Abe, M., Mishima, Y., Sakimura, K., and Kominami, R. (2013). Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one Bcl11b allele. *Cancer Sci.* *104*, 1009–1016.

Golonzhka, O., Leid, M., Indra, G., and Indra, A.K. (2007). Expression of COUP-TF-interacting protein 2 (CTIP2) in mouse skin during development and in adulthood. *Gene Expr. Patterns GEP* 7, 754–760.

Golonzhka, O., Liang, X., Messaddeq, N., Bornert, J.-M., Campbell, A.L., Metzger, D., Chambon, P., Ganguli-Indra, G., Leid, M., and Indra, A.K. (2009a). Dual role of COUP-TF-interacting protein 2 in epidermal homeostasis and permeability barrier formation. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1459–1470.

Golonzhka, O., Metzger, D., Bornert, J.-M., Bay, B.K., Gross, M.K., Kioussi, C., and Leid, M. (2009b). Ctip2/Bcl11b controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4278–4283.

Gong, Z., Brackertz, M., and Renkawitz, R. (2006). SUMO modification enhances p66-mediated transcriptional repression of the Mi-2/NuRD complex. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4519–4528.

Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Depke, M., Völker, U., Bahr, J., Assmus, K., Bröker, B.M., Walther, R., and Schmidt, C.A. (2007). Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene* 26, 3797–3810.

Grimm, C., Spörle, R., Schmid, T.E., Adler, I.D., Adamski, J., Schughart, K., and Graw, J. (1999). Isolation and embryonic expression of the novel mouse gene Hic1, the homologue of HIC1, a candidate gene for the Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 8, 697–710.

Guerardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A.K., and Leprince, D. (2001). Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J. Biol. Chem.* 276, 3078–3089.

Le Guezennec, X., Vermeulen, M., Brinkman, A.B., Hoeijmakers, W.A.M., Cohen, A., Lasonder, E., and Stunnenberg, H.G. (2006). MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, Two Distinct Complexes with Different Biochemical and Functional Properties. *Mol. Cell. Biol.* 26, 843–851.

Gurard-Levin, Z.A., and Almouzni, G. (2014). Histone modifications and a choice of variant: a language that helps the genome express itself. *F1000prime Rep.* 6, 76.

Gururaj, A.E., Singh, R.R., Rayala, S.K., Holm, C., den Hollander, P., Zhang, H., Balasenthil, S., Talukder, A.H., Landberg, G., and Kumar, R. (2006). MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6670–6675.

Gutierrez, A., Kentsis, A., Sanda, T., Holmfeldt, L., Chen, S.-C., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Dahlberg, S.E., Neuberg, D.S., et al. (2011). The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 4169–4173.

Hardivillé, S., and Hart, G.W. (2014). Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab.* 20, 208–213.

Helbling Chadwick, L., Chadwick, B.P., Jaye, D.L., and Wade, P.A. (2009). The Mi-2/NuRD complex associates with pericentromeric heterochromatin during S phase in rapidly proliferating lymphoid cells. *Chromosoma* 118, 445–457.

Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.-Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C., and Blobel, G.A. (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J.* 24, 2367–2378.

Huang, X., Chen, S., Shen, Q., Chen, S., Yang, L., Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Schmidt, C.A., and Li, Y. (2011). Down regulation of BCL11B expression inhibits proliferation and induces apoptosis in malignant T cells by BCL11B-935-siRNA. *Hematol. Amst. Neth.* 16, 236–242.

Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2010). An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* 329, 93–96.

Issa, J.P., Zehnauer, B.A., Kaufmann, S.H., Biel, M.A., and Baylin, S.B. (1997). HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res.* 57, 1678–1681.

Janeckova, L., Pospichalova, V., Fafilek, B., Vojtechova, M., Tureckova, J., Dobes, J., Dubuissez, M., Leprince, D., Baloghova, N., Horazna, M., et al. (2015). HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF-kappaB Signaling and Promotes Tissue Damage-associated Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res. MCR.*

Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., Vorburger, S.A., Tobler, A., Leprince, D., Fey, M.F., Helin, K., et al. (2009). The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 916–922.

Jenal, M., Britschgi, C., Fey, M.F., and Tschan, M.P. (2010). Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor--not just a question of promoter hypermethylation? *Swiss Med. Wkly.* 140, w13106.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.

Kai, L., Samuel, S.K., and Levenson, A.S. (2010). Resveratrol enhances p53 acetylation and apoptosis in prostate cancer by inhibiting MTA1/NuRD complex. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 126, 1538–1548.

Kaji, K., Nichols, J., and Hendrich, B. (2007). Mbd3, a component of the NuRD co-repressor complex, is required for development of pluripotent cells. *Dev. Camb. Engl.* 134, 1123–1132.

Kamimura, K., Mishima, Y., Obata, M., Endo, T., Aoyagi, Y., and Kominami, R. (2007). Lack of Bcl11b tumor suppressor results in vulnerability to DNA replication stress and damages. *Oncogene* 26, 5840–5850.

Kastner, P., Chan, S., Vogel, W.K., Zhang, L.-J., Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Jost, B., Le Gras, S., Gross, M.K., and Leid, M. (2010).

Bcl11b represses a mature T-cell gene expression program in immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 40, 2143–2154.

Kaur, E., Gupta, S., and Dutt, S. (2014). Clinical implications of MTA proteins in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 1017–1024.

Khaled, W.T., Choon Lee, S., Stingl, J., Chen, X., Raza Ali, H., Rueda, O.M., Hadi, F., Wang, J., Yu, Y., Chin, S.-F., et al. (2015). BCL11A is a triple-negative breast cancer gene with critical functions in stem and progenitor cells. *Nat. Commun.* 6, 5987.

Kleene, R., Zdziebło, J., Wege, K., and Kern, H.F. (1999). A novel zymogen granule protein (ZG29p) and the nuclear protein MTA1p are differentially expressed by alternative transcription initiation in pancreatic acinar cells of the rat. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 15), 2539–2548.

Kleene, R., Classen, B., Zdziebło, J., and Schrader, M. (2000). SH3 binding sites of ZG29p mediate an interaction with amylase and are involved in condensation-sorting in the exocrine rat pancreas. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 9893–9900.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89–97.

Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.

Kolla, V., Naraparaju, K., Zhuang, T., Higashi, M., Kolla, S., Blobel, G.A., and Brodeur, G.M. (2015). The Tumor Suppressor CHD5 Forms a NuRD-type Chromatin Remodeling Complex. *Biochem. J.*

Kominami, R. (2012). Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 72–87.

Kornacki, J.R., Stuparu, A.D., and Mrksich, M. (2015). Acetyltransferase p300/CBP associated Factor (PCAF) regulates crosstalk-dependent acetylation of histone H3 by distal site recognition. *ACS Chem. Biol.* 10, 157–164.

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

Kumar, S. (2014). P53 induction accompanying G2/M arrest upon knockdown of tumor suppressor HIC1 in U87MG glioma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 395, 281–290.

Kumar, R., Wang, R.-A., Mazumdar, A., Talukder, A.H., Mandal, M., Yang, Z., Bagheri-Yarmand, R., Sahin, A., Hortobagyi, G., Adam, L., et al. (2002). A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418, 654–657.

Kumar, R., Balasenthil, S., Manavathi, B., Rayala, S.K., and Pakala, S.B. (2010a). Metastasis-associated protein 1 and its short form variant stimulates Wnt1 transcription through promoting its derepression from Six3 corepressor. *Cancer Res.* 70, 6649–6658.

Kumar, R., Balasenthil, S., Pakala, S.B., Rayala, S.K., Sahin, A.A., and Ohshiro, K. (2010b). Metastasis-associated protein 1 short form stimulates Wnt1 pathway in mammary epithelial and cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 6598–6608.

Kusam, S., and Dent, A. (2007). Common mechanisms for the regulation of B cell differentiation and transformation by the transcriptional repressor protein BCL-6. *Immunol. Res.* *37*, 177–186.

Kuwata, T., and Nakamura, T. (2008). BCL11A is a SUMOylated protein and recruits SUMO-conjugation enzymes in its nuclear body. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *13*, 931–940.

Lauberth, S.M., Bilyeu, A.C., Firulli, B.A., Kroll, K.L., and Rauchman, M. (2007). A phosphomimetic mutation in the Sall1 repression motif disrupts recruitment of the nucleosome remodeling and deacetylase complex and repression of Gbx2. *J. Biol. Chem.* *282*, 34858–34868.

Lefebvre, T., Pinte, S., Guérardel, C., Deltour, S., Martin-Soudant, N., Slomianny, M.-C., Michalski, J.-C., and Leprince, D. (2004). The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur. J. Biochem. FEBS* *271*, 3843–3854.

Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Jüttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., and Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 3195–3205.

Leid, M., Ishmael, J.E., Avram, D., Shepherd, D., Fraulob, V., and Dollé, P. (2004). CTIP1 and CTIP2 are differentially expressed during mouse embryogenesis. *Gene Expr. Patterns GEP* *4*, 733–739.

Lejon, S., Thong, S.Y., Murthy, A., AlQarni, S., Murzina, N.V., Blobel, G.A., Laue, E.D., and Mackay, J.P. (2011). Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48·FOG-1 complex. *J. Biol. Chem.* *286*, 1196–1203.

Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., and Allis, C.D. (2013). Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* *340*, 857–861.

Li, D.-Q., Divijendra Natha Reddy, S., Pakala, S.B., Wu, X., Zhang, Y., Rayala, S.K., and Kumar, R. (2009a). MTA1 coregulator regulates p53 stability and function. *J. Biol. Chem.* *284*, 34545–34552.

Li, D.-Q., Ohshiro, K., Reddy, S.D.N., Pakala, S.B., Lee, M.-H., Zhang, Y., Rayala, S.K., and Kumar, R. (2009b). E3 ubiquitin ligase COP1 regulates the stability and functions of MTA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17493–17498.

Li, D.-Q., Ohshiro, K., Khan, M.N., and Kumar, R. (2010a). Requirement of MTA1 in ATR-mediated DNA damage checkpoint function. *J. Biol. Chem.* *285*, 19802–19812.

Li, D.-Q., Pakala, S.B., Reddy, S.D.N., Ohshiro, K., Peng, S.-H., Lian, Y., Fu, S.W., and Kumar, R. (2010b). Revelation of p53-independent function of

MTA1 in DNA damage response via modulation of the p21 WAF1-proliferating cell nuclear antigen pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 10044–10052.

Li, K., Dias, S.J., Rimando, A.M., Dhar, S., Mizuno, C.S., Penman, A.D., Lewin, J.R., and Levenson, A.S. (2013). Pterostilbene acts through metastasis-associated protein 1 to inhibit tumor growth, progression and metastasis in prostate cancer. *PloS One* 8, e57542.

Li, L., Leid, M., and Rothenberg, E.V. (2010c). An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* 329, 89–93.

Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.-C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., et al. (2010d). Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 329, 85–89.

Li, W., Jiang, Z., Li, T., Wei, X., Zheng, Y., Wu, D., Yang, L., Chen, S., Xu, B., Zhong, M., et al. (2015). Genome-wide analyses identify KLF4 as an important negative regulator in T-cell acute lymphoblastic leukemia through directly inhibiting T-cell associated genes. *Mol. Cancer* 14, 26.

Lin, A.C., Roche, A.E., Wilk, J., and Svensson, E.C. (2004). The N termini of Friend of GATA (FOG) proteins define a novel transcriptional repression motif and a superfamily of transcriptional repressors. *J. Biol. Chem.* 279, 55017–55023.

Lin, Y.-M., Wang, C.-M., Jeng, J.-C., Leprince, D., and Shih, H.-M. (2013). HIC1 interacts with and modulates the activity of STAT3. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2266–2276.

Liu, H., Ippolito, G.C., Wall, J.K., Niu, T., Probst, L., Lee, B.-S., Pulford, K., Banham, A.H., Stockwin, L., Shaffer, A.L., et al. (2006). Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol. Cancer* 5, 18.

Liu, J., Wang, H., Huang, C., and Qian, H. (2014). Subcellular localization of MTA proteins in normal and cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 843–856.

Liu, J., Wang, H., Ma, F., Xu, D., Chang, Y., Zhang, J., Wang, J., Zhao, M., Lin, C., Huang, C., et al. (2015). MTA1 regulates higher-order chromatin structure and histone H1-chromatin interaction in-vivo. *Mol. Oncol.* 9, 218–235.

Liu, P., Keller, J.R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R.A., Nakamura, T., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat. Immunol.* 4, 525–532.

Liu, S.-L., Han, Y., Zhang, Y., Xie, C.-Y., Wang, E.-H., Miao, Y., Li, H.-Y., Xu, H.-T., and Dai, S.-D. (2012). Expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) might predict proliferation in non-small cell lung cancer. *Target. Oncol.* 7, 135–143.

Luo, M., Ling, T., Xie, W., Sun, H., Zhou, Y., Zhu, Q., Shen, M., Zong, L., Lyu, G., Zhao, Y., et al. (2013). NuRD blocks reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 1278–1286.

Luo, Y., Jian, W., Stavreva, D., Fu, X., Hager, G., Bungert, J., Huang, S., and Qiu, Y. (2009). Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation. *J. Biol. Chem.* 284, 34901–34910.

Manavathi, B., Singh, K., and Kumar, R. (2007). MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nucl. Recept. Signal.* 5, e010.

Mansfield, R.E., Musselman, C.A., Kwan, A.H., Oliver, S.S., Garske, A.L., Davrazou, F., Denu, J.M., Kutateladze, T.G., and Mackay, J.P. (2011). Plant homeodomain (PHD) fingers of CHD4 are histone H3-binding modules with preference for unmodified H3K4 and methylated H3K9. *J. Biol. Chem.* 286, 11779–11791.

Marban, C., Redel, L., Suzanne, S., Van Lint, C., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Leid, M., Aunis, D., Schaeffer, E., and Rohr, O. (2005). COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells. *Nucleic Acids Res.* 33, 2318–2331.

Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 26, 412–423.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349.

Marino, S., and Nusse, R. (2007). Mutants in the mouse NuRD/Mi2 component P66alpha are embryonic lethal. *PloS One* 2, e519.

Mazumdar, A., Wang, R.A., Mishra, S.K., Adam, L., Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Vadlamudi, R.K., and Kumar, R. (2001). Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nat. Cell Biol.* 3, 30–37.

Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G.D., Wang, H., Yu, X., Choi, J.K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M., et al. (2010). NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J.* 29, 442–456.

Millard, C.J., Watson, P.J., Celardo, I., Gordiyenko, Y., Cowley, S.M., Robinson, C.V., Fairall, L., and Schwabe, J.W.R. (2013). Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. *Mol. Cell* 51, 57–67.

Millard, C.J., Fairall, L., and Schwabe, J.W.R. (2014). Towards an understanding of the structure and function of MTA1. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 857–867.

Mishra, S.K., Yang, Z., Mazumdar, A., Talukder, A.H., Larose, L., and Kumar, R. (2004). Metastatic tumor antigen 1 short form (MTA1s) associates

with casein kinase I-gamma2, an estrogen-responsive kinase. *Oncogene* 23, 4422–4429.

Mohammad, H.P., Zhang, W., Prevas, H.S., Leadem, B.R., Zhang, M., Herman, J.G., Hooker, C.M., Watkins, D.N., Karim, B., Huso, D.L., et al. (2011). Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc(Δ 716) mice. *Oncogene* 30, 2659–2669.

Molli, P.R., Singh, R.R., Lee, S.W., and Kumar, R. (2008). MTA1-mediated transcriptional repression of BRCA1 tumor suppressor gene. *Oncogene* 27, 1971–1980.

Moon, H.-E., Cheon, H., and Lee, M.-S. (2007). Metastasis-associated protein 1 inhibits p53-induced apoptosis. *Oncol. Rep.* 18, 1311–1314.

Morra, R., Lee, B.M., Shaw, H., Tuma, R., and Mancini, E.J. (2012). Concerted action of the PHD, chromo and motor domains regulates the human chromatin remodelling ATPase CHD4. *FEBS Lett.* 586, 2513–2521.

Murzina, N.V., Pei, X.-Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., Luisi, B.F., et al. (2008). Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 1077–1085.

Musselman, C.A., Mansfield, R.E., Garske, A.L., Davrazou, F., Kwan, A.H., Oliver, S.S., O’Leary, H., Denu, J.M., Mackay, J.P., and Kutateladze, T.G. (2009). Binding of the CHD4 PHD2 finger to histone H3 is modulated by covalent modifications. *Biochem. J.* 423, 179–187.

Nair, S.S., Li, D.-Q., and Kumar, R. (2013). A core chromatin remodeling factor instructs global chromatin signaling through multivalent reading of nucleosome codes. *Mol. Cell* 49, 704–718.

Nakamura, T., Yamazaki, Y., Saiki, Y., Moriyama, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2000). Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3178–3186.

Nicolson, G.L., Nawa, A., Toh, Y., Taniguchi, S., Nishimori, K., and Moustafa, A. (2003). Tumor metastasis-associated human MTA1 gene and its MTA1 protein product: role in epithelial cancer cell invasion, proliferation and nuclear regulation. *Clin. Exp. Metastasis* 20, 19–24.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 16, 479–489.

Obata, M., Kominami, R., and Mishima, Y. (2012). BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. *Cell. Signal.* 24, 1047–1052.

Ohshiro, K., Rayala, S.K., Wigerup, C., Pakala, S.B., Natha, R.S.D., Gururaj, A.E., Molli, P.R., Månsson, S.S., Ramezani, A., Hawley, R.G., et al.

(2010). Acetylation-dependent oncogenic activity of metastasis-associated protein 1 co-regulator. *EMBO Rep.* *11*, 691–697.

Oku, T., Nakano, M., Kaneko, Y., Ando, Y., Kenmotsu, H., Itoh, S., Tsuiji, M., Seyama, Y., Toyoshima, S., and Tsuji, T. (2012). Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/coronin-1 regulates the interaction with actin. *J. Biol. Chem.* *287*, 42910–42920.

Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* *127*, 635–648.

Pakala, S.B., Rayala, S.K., Wang, R.-A., Ohshiro, K., Mudvari, P., Reddy, S.D.N., Zheng, Y., Pires, R., Casimiro, S., Pillai, M.R., et al. (2013). MTA1 promotes STAT3 transcription and pulmonary metastasis in breast cancer. *Cancer Res.* *73*, 3761–3770.

Parekh, S., Polo, J.M., Shaknovich, R., Juszczynski, P., Lev, P., Ranuncolo, S.M., Yin, Y., Klein, U., Cattoretti, G., Dalla Favera, R., et al. (2007). BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* *110*, 2067–2074.

Pateras, I.S., Apostolopoulou, K., Niforou, K., Kotsinas, A., and Gorgoulis, V.G. (2009). p57KIP2: “Kip”ing the cell under control. *Mol. Cancer Res. MCR* *7*, 1902–1919.

Pérez-Sayáns, M., Somoza-Martín, J.M., Barros-Angueira, F., Diz, P.G., Gándara Rey, J.M., and García-García, A. (2010). Beta-adrenergic receptors in cancer: therapeutic implications. *Oncol. Res.* *19*, 45–54.

Pflum, M.K., Tong, J.K., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J. Biol. Chem.* *276*, 47733–47741.

Picaud, S., Costa, D.D., Thanasopoulou, A., Filippakopoulos, P., Fish, P.V., Philpott, M., Fedorov, O., Brennan, P., Bunnage, M.E., Owen, D.R., et al. (2013). PFI-1, a Highly Selective Protein Interaction Inhibitor, Targeting BET Bromodomains. *Cancer Res.* *73*, 3336–3346.

Pinte, S., Guérardel, C., Deltour-Balerdi, S., Godwin, A.K., and Leprince, D. (2004a). Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1. *Oncogene* *23*, 4023–4031.

Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B.R., Guérardel, C., and Leprince, D. (2004b). The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J. Biol. Chem.* *279*, 38313–38324.

Pitt, L.A., Tikhonova, A.N., Hu, H., Trimarchi, T., King, B., Gong, Y., Sanchez-Martin, M., Tsirigos, A., Littman, D.R., Ferrando, A.A., et al. (2015). CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. *Cancer Cell* *27*, 755–768.

Polo, S.E., Kaidi, A., Baskcomb, L., Galanty, Y., and Jackson, S.P. (2010). Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *EMBO J.* 29, 3130–3139.

Potts, R.C., Zhang, P., Wurster, A.L., Precht, P., Mughal, M.R., Wood, W.H., Zhang, Y., Becker, K.G., Mattson, M.P., and Pazin, M.J. (2011). CHD5, a brain-specific paralog of Mi2 chromatin remodeling enzymes, regulates expression of neuronal genes. *PloS One* 6, e24515.

Qian, Y.W., Wang, Y.C., Hollingsworth, R.E., Jones, D., Ling, N., and Lee, E.Y. (1993). A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* 364, 648–652.

Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., et al. (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 502, 65–70.

Van Rechem, C., Rood, B.R., Touka, M., Pinte, S., Jenal, M., Guérardel, C., Ramsey, K., Monté, D., Bégue, A., Tschan, M.P., et al. (2009a). Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J. Biol. Chem.* 284, 20927–20935.

Van Rechem, C., Boulay, G., and Leprince, D. (2009b). HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 586–590.

Van Rechem, C., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., and Leprince, D. (2010). Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4045–4059.

Reddy, S.D.N., Pakala, S.B., Ohshiro, K., Rayala, S.K., and Kumar, R. (2009). MicroRNA-661, a c/EBPalpha target, inhibits metastatic tumor antigen 1 and regulates its functions. *Cancer Res.* 69, 5639–5642.

Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., Behrens, A., Bertone, P., and Hendrich, B. (2012). NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J.* 31, 593–605.

Roche, A.E., Bassett, B.J., Samant, S.A., Hong, W., Blobel, G.A., and Svensson, E.C. (2008). The zinc finger and C-terminal domains of MTA proteins are required for FOG-2-mediated transcriptional repression via the NuRD complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 352–360.

Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J. Virol.* 77, 5415–5427.

Saether, T., Berge, T., Ledsaak, M., Matre, V., Alm-Kristiansen, A.H., Dahle, O., Aubry, F., and Gabrielsen, O.S. (2007). The chromatin remodeling

factor Mi-2alpha acts as a novel co-activator for human c-Myb. *J. Biol. Chem.* 282, 13994–14005.

Saiki, Y., Yamazaki, Y., Yoshida, M., Katoh, O., and Nakamura, T. (2000). Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. *Genomics* 70, 387–391.

Sánchez-Martín, L., Sánchez-Mateos, P., and Cabañas, C. (2013). CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol. Med.* 19, 12–22.

Sankaran, V.G., and Orkin, S.H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, a011643.

Sankaran, V.G., Menne, T.F., Xu, J., Akie, T.E., Lettre, G., Van Handel, B., Mikkola, H.K.A., Hirschhorn, J.N., Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2008). Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 322, 1839–1842.

Sankaran, V.G., Xu, J., Ragozy, T., Ippolito, G.C., Walkley, C.R., Maika, S.D., Fujiwara, Y., Ito, M., Groudine, M., Bender, M.A., et al. (2009). Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 460, 1093–1097.

Dos Santos, R.L., Tosti, L., Radzsheuskaya, A., Caballero, I.M., Kaji, K., Hendrich, B., and Silva, J.C.R. (2014). MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner. *Cell Stem Cell* 15, 102–110.

Satterwhite, E., Sonoki, T., Willis, T.G., Harder, L., Nowak, R., Arriola, E.L., Liu, H., Price, H.P., Gesk, S., Steinemann, D., et al. (2001). The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98, 3413–3420.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.

Scourzic, L., Mouly, E., and Bernard, O.A. (2015). TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.* 7.

Segré, C.V., and Chiocca, S. (2011). Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 690848.

Senawong, T., Peterson, V.J., Avram, D., Shepherd, D.M., Frye, R.A., Minucci, S., and Leid, M. (2003). Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 278, 43041–43050.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.

Shirakawa, K., Chavez, L., Hakre, S., Calvanese, V., and Verdin, E. (2013). Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol.* *21*, 277–285.

Simpson, A., Uitto, J., Rodeck, U., and Mahoney, M.G. (2001). Differential expression and subcellular distribution of the mouse metastasis-associated proteins Mta1 and Mta3. *Gene* *273*, 29–39.

Sims, J.K., and Wade, P.A. (2011). Mi-2/NuRD complex function is required for normal S phase progression and assembly of pericentric heterochromatin. *Mol. Biol. Cell* *22*, 3094–3102.

Singh, B.N., Zhang, G., Hwa, Y.L., Li, J., Dowdy, S.C., and Jiang, S.-W. (2010). Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *10*, 935–954.

Singh, K., Cassano, M., Planet, E., Sebastian, S., Jang, S.M., Sohi, G., Faralli, H., Choi, J., Youn, H.-D., Dilworth, F.J., et al. (2015). A KAP1 phosphorylation switch controls MyoD function during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* *29*, 513–525.

Singh, M.M., Manton, C.A., Bhat, K.P., Tsai, W.-W., Aldape, K., Barton, M.C., and Chandra, J. (2011). Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastoma cells to histone deacetylase inhibitors. *Neuro-Oncol.* *13*, 894–903.

Smeenk, G., Wiegant, W.W., Vrolijk, H., Solari, A.P., Pastink, A., and van Attikum, H. (2010). The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J. Cell Biol.* *190*, 741–749.

Smits, A.H., Jansen, P.W.T.C., Poser, I., Hyman, A.A., and Vermeulen, M. (2013). Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. *Nucleic Acids Res.* *41*, e28.

Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007). An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2661–2675.

Streubel, G., Bouchard, C., Berberich, H., Zeller, M.S., Teichmann, S., Adamkiewicz, J., Müller, R., Klempnauer, K.-H., and Bauer, U.-M. (2013). PRMT4 is a novel coactivator of c-Myb-dependent transcription in haematopoietic cell lines. *PLoS Genet.* *9*, e1003343.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* *324*, 930–935.

Tang, B., Di Lena, P., Schaffer, L., Head, S.R., Baldi, P., and Thomas, E.A. (2011). Genome-wide identification of Bcl11b gene targets reveals role in brain-derived neurotrophic factor signaling. *PloS One* *6*, e23691.

- Thompson, P.M., Gotoh, T., Kok, M., White, P.S., and Brodeur, G.M. (2003). CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 22, 1002–1011.
- Toh, Y., and Nicolson, G.L. (2009). The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 215–227.
- Toh, Y., and Nicolson, G.L. (2014a). Identification and characterization of metastasis-associated gene/protein 1 (MTA1). *Cancer Metastasis Rev.* 33, 837–842.
- Toh, Y., and Nicolson, G.L. (2014b). Properties and clinical relevance of MTA1 protein in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 891–900.
- Toh, Y., Pencil, S.D., and Nicolson, G.L. (1994). A novel candidate metastasis-associated gene, *mta1*, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J. Biol. Chem.* 269, 22958–22963.
- Toh, Y., Pencil, S.D., and Nicolson, G.L. (1995). Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, *mta1*, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. *Gene* 159, 97–104.
- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Schreiber, S.L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917–921.
- Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V.J., Barrett, B., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T.M., and Leid, M. (2006). CTIP2 associates with the NuRD complex on the promoter of p57KIP2, a newly identified CTIP2 target gene. *J. Biol. Chem.* 281, 32272–32283.
- Torchy, M.P., Hamiche, A., and Klaholz, B.P. (2015). Structure and function insights into the NuRD chromatin remodeling complex. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.
- Tyler, J.K., and Kadonaga, J.T. (1999). The “dark side” of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* 99, 443–446.
- Valenta, T., Lukas, J., Doubravska, L., Fafulek, B., and Korinek, V. (2006). HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J.* 25, 2326–2337.
- Varambally, S., Cao, Q., Mani, R.-S., Shankar, S., Wang, X., Ateeq, B., Laxman, B., Cao, X., Jing, X., Ramnarayanan, K., et al. (2008). Genomic Loss of microRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer. *Science* 322, 1695–1699.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149–159.

Vázquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N.J., Swaim, W.D., Nares, S., Ott, D.E., Schubert, U., Henklein, P., Orenstein, J.M., Sporn, M.B., et al. (2005). Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J. Virol.* *79*, 4479–4491.

Vilgelm, A.E., Hong, S.-M., Washington, M.K., Wei, J., Chen, H., El-Rifai, W., and Zaika, A. (2010). Characterization of Δ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene* *29*, 5861–5868.

Waddington, C.H. (2012). The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* *41*, 10–13.

Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., and Wolffe, A.P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* *23*, 62–66.

Wakabayashi, Y., Inoue, J., Takahashi, Y., Matsuki, A., Kosugi-Okano, H., Shinbo, T., Mishima, Y., Niwa, O., and Kominami, R. (2003a). Homozygous deletions and point mutations of the *Rit1/Bcl11b* gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 598–603.

Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., et al. (2003b). *Bcl11b* is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat. Immunol.* *4*, 533–539.

Wales, M.M., Biel, M.A., el Deiry, W., Nelkin, B.D., Issa, J.P., Cavenee, W.K., Kuerbitz, S.J., and Baylin, S.B. (1995). p53 activates expression of *HIC-1*, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat. Med.* *1*, 570–577.

Wang, R.-A. (2014). MTA1--a stress response protein: a master regulator of gene expression and cancer cell behavior. *Cancer Metastasis Rev.* *33*, 1001–1009.

Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D., et al. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1025–1031.

Wang, F., Marshall, C.B., and Ikura, M. (2013). Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3989–4008.

Wang, Y., Zhang, H., Chen, Y., Sun, Y., Yang, F., Yu, W., Liang, J., Sun, L., Yang, X., Shi, L., et al. (2009). LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell* *138*, 660–672.

Wang, Z., Zhang, L.-J., Guha, G., Li, S., Kyrylkova, K., Kioussi, C., Leid, M., Ganguli-Indra, G., and Indra, A.K. (2012). Selective ablation of *Ctip2/Bcl11b* in epidermal keratinocytes triggers atopic dermatitis-like skin inflammatory responses in adult mice. *PLoS One* *7*, e51262.

Watson, A.A., Mahajan, P., Mertens, H.D.T., Deery, M.J., Zhang, W., Pham, P., Du, X., Bartke, T., Zhang, W., Edlich, C., et al. (2012). The PHD and chromo domains regulate the ATPase activity of the human chromatin remodeler CHD4. *J. Mol. Biol.* *422*, 3–17.

Whyte, P., Williamson, N.M., and Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* *56*, 67–75.

Wilson, B.G., and Roberts, C.W.M. (2011). SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 481–492.

Wu, M., Wang, L., Li, Q., Li, J., Qin, J., and Wong, J. (2013). The MTA family proteins as novel histone H3 binding proteins. *Cell Biosci.* *3*, 1.

Xu, J., Sankaran, V.G., Ni, M., Menne, T.F., Puram, R.V., Kim, W., and Orkin, S.H. (2010). Transcriptional silencing of γ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev.* *24*, 783–798.

Xu, J., Bauer, D.E., Kerenyi, M.A., Vo, T.D., Hou, S., Hsu, Y.-J., Yao, H., Trowbridge, J.J., Mandel, G., and Orkin, S.H. (2013). Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 6518–6523.

Yoo, Y.-G., Kong, G., and Lee, M.-O. (2006). Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J.* *25*, 1231–1241.

Yu, Y., Wang, J., Khaled, W., Burke, S., Li, P., Chen, X., Yang, W., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Zhang, S., et al. (2012). Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J. Exp. Med.* *209*, 2467–2483.

Zhang, B., Chambers, K.J., Leprince, D., Faller, D.V., and Wang, S. (2009). Requirement for chromatin-remodeling complex in novel tumor suppressor HIC1-mediated transcriptional repression and growth control. *Oncogene* *28*, 651–661.

Zhang, H., Singh, R.R., Talukder, A.H., and Kumar, R. (2006). Metastatic tumor antigen 3 is a direct corepressor of the Wnt4 pathway. *Genes Dev.* *20*, 2943–2948.

Zhang, J., Jackson, A.F., Naito, T., Dose, M., Seavitt, J., Liu, F., Heller, E.J., Kashiwagi, M., Yoshida, T., Gounari, F., et al. (2012a). Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat. Immunol.* *13*, 86–94.

Zhang, L., Vogel, W.K., Liu, X., Topark-Ngarm, A., Arbogast, B.L., Maier, C.S., Filtz, T.M., and Leid, M. (2012b). Coordinated regulation of transcription factor Bcl11b activity in thymocytes by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and protein sumoylation. *J. Biol. Chem.* *287*, 26971–26988.

Zhang, Q., Wang, S.-Y., Fleuriel, C., Leprince, D., Rocheleau, J.V., Piston, D.W., and Goodman, R.H. (2007). Metabolic regulation of SIRT1

transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 829–833.

Zhang, W., Zeng, X., Briggs, K.J., Beaty, R., Simons, B., Chiu Yen, R.-W., Tyler, M.A., Tsai, H.-C., Ye, Y., Gesell, G.S., et al. (2010). A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1. *Oncogene* *29*, 2467–2476.

Zhang, X.-Y., DeSalle, L.M., Patel, J.H., Capobianco, A.J., Yu, D., Thomas-Tikhonenko, A., and McMahon, S.B. (2005). Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is an essential downstream effector of the c-MYC oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13968–13973.

Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* *13*, 1924–1935.

Zhao, G., Qin, Q., Zhang, J., Liu, Y., Deng, S., Liu, L., Wang, B., Tian, K., and Wang, C. (2013). Hypermethylation of HIC1 promoter and aberrant expression of HIC1/SIRT1 might contribute to the carcinogenesis of pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *20 Suppl 3*, S301–S311.

Zhou, D., Liu, K., Sun, C.-W., Pawlik, K.M., and Townes, T.M. (2010). KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat. Genet.* *42*, 742–744.

ANNEXES

1 Publication n°4

Hypermethylated In Cancer 1 (HIC1) recruits Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human Polycom-like (hPCL) proteins

J. Biol. Chem. 287, 10509-24

Gaylor Boulay, Marion Dubuissez, Capucine Van Rechem, Antoine Forget, Kristian Helin, Olivier Ayrault and Dominique Leprince

Cet article est une partie des travaux de Thèse de Gaylor Boulay, l'étudiant en thèse me précédant dans le groupe. A partir d'un crible double-hybride en levure avec les régions BTB-RC de HIC1 comme appât, les protéines hPCL3 ont été isolées. Ces protéines ainsi que leur paralogue PHF1, permettent à HIC1 de recruter les complexes PRC2 au niveau de certains de ses gènes cibles dont *Atoh1* afin de réprimer son expression au cours du développement du cervelet.

Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) Recruits Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) to a Subset of Its Target Genes through Interaction with Human Polycomb-like (hPCL) Proteins^{*[5]}

Received for publication, November 3, 2011, and in revised form, January 31, 2012. Published, JBC Papers in Press, February 7, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.320234

Gaylor Boulay^{†1}, Marion Dubuissez[‡], Capucine Van Rechem^{‡2}, Antoine Forget^{§3}, Kristian Helin^{¶1}, Olivier Ayrault^{§3}, and Dominique Leprince^{†4}

From the [†]CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille 59021, France, the [§]Institut Curie, CNRS UMR 3306, INSERM U1005, Centre Universitaire, Orsay 91405, France, and the [¶]BRIC, University of Copenhagen, Ole Maaløes vej, 5, Dk-2200, Copenhagen, Denmark

Background: HIC1 is a transcriptional repressor recruiting CtBP and NuRD complexes.

Results: HIC1 interacts with human Polycomb-like proteins.

Conclusion: HIC1 recruits the *Polycomb* PRC2 on a subset of its target genes through interactions with Polycomb-like proteins.

Significance: Our results implicate hPCL proteins in the recruitment of PRC2 by transcription factors in mammals.

HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) is a tumor suppressor gene epigenetically silenced or deleted in many human cancers. HIC1 is involved in regulatory loops modulating p53- and E2F1-dependent cell survival, growth control, and stress responses. HIC1 is also essential for normal development because *Hic1*-deficient mice die perinatally and exhibit gross developmental defects throughout the second half of development. HIC1 encodes a transcriptional repressor with five C₂H₂ zinc fingers mediating sequence-specific DNA binding and two repression domains: an N-terminal BTB/POZ domain and a central region recruiting CtBP and NuRD complexes. By yeast two-hybrid screening, we identified the *Polycomb-like* protein hPCL3 as a novel co-repressor for HIC1. Using multiple biochemical strategies, we demonstrated that HIC1 interacts with hPCL3 and its paralog PHF1 to form a stable complex with the PRC2 members EZH2, EED, and Suz12. Confirming the implication of HIC1 in *Polycomb* recruitment, we showed that HIC1 shares some of its target genes with PRC2, including *ATOH1*. Depletion of HIC1 by siRNA interference leads to a partial displacement of EZH2 from the *ATOH1* promoter. Furthermore, *in vivo*, *ATOH1* repression by HIC1 is associated with Polycomb activity during mouse cerebellar development. Thus, our results identify HIC1 as the first transcription factor in mammals able to recruit PRC2 to some target promoters through its interaction with *Polycomb-like* proteins.

Polycomb are maintenance repressive complexes important for development, stem cell renewal, and cancer (1). Polycomb group (PcG)⁵ proteins were first discovered in *Drosophila* for their role in the regulation of *Hox* genes during development and are now recognized as global epigenetic transcriptional regulators of cell fate decisions in all metazoans. They are organized in multiprotein modifying-chromatin complexes of variable composition (2). In mammals, the best characterized complexes are Polycomb repressive complexes 1 and 2 (PRC1 and PRC2). The PRC2 complex is composed of three core proteins, the histone methyltransferase EZH1 or EZH2, SUZ12, and one of the EED isoforms. EZH2 catalyzes the dimethylation and trimethylation of lysine 27 of histone 3 thereby generating an epigenetic repressive mark bound by the Polycomb (Pc) protein of PRC1 (2, 3).

In addition to these core components, PRC2 is associated with co-factors that are essential to modulate its activity and/or its recruitment to specific loci in embryonic stem cells, such as the recently characterized JARID2 protein, which contains an AT-rich DNA-binding domain (4, 5). However, the first PRC2 co-factor, Polycomb-like (PCL) was discovered in *Drosophila* through biochemical characterization of a 1-MDa complex distinct from the prominent 600-kDa E(z) complex PRC2 (6). In line with the significant expansion of *PcG* genes during evolution, three human orthologs of *Drosophila Polycomb-like* have been characterized, *hPCL1/PHF1* (*human Polycomb-like 1/PHD finger protein 1*) (7), *hPCL2/MTF2* (7, 8), and *hPCL3/PHF19* (9). These three genes are differentially expressed suggesting that their expression pattern could provide other potential regulatory mechanisms to PcG target genes. Indeed, *PHF1* and *hPCL3* are widely expressed in different normal tissues with some examples of co-expression (7, 8). *hPCL3* is also

* This work was supported in part by grants from the CNRS, the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Interrégional du Septentrion), the Fondation pour la Recherche Médicale (Comité du Nord), and the Association pour la Recherche contre le Cancer (to D. L.).

[5] This article contains supplemental Fig. S1 and Table S1.

¹ Supported by fellowships from the CNRS/Région Nord-Pas de Calais and the Association pour la Recherche contre le Cancer.

² Present addresses: Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital Cancer Center, Charlestown, MA 02129.

³ Supported by a AVENIR/INSERM/Inca grant.

⁴ To whom correspondence should be addressed: CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 Rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France. Tel.: 00-33-3-20-87-11-19; Fax: 00-33-3-20-87-11-11; E-mail: dominique.leprince@ibl.fr.

⁵ The abbreviations used are: PcG, Polycomb group; PRC, Polycomb repressive complex; PCL, Polycomb-like; PHD, plant homeodomain; qRT, quantitative reverse transcriptase; CR, central region; NLS, nuclear localization signal. ESC, extra sex combs; EED, embryonic ectoderm development; Suz12, suppressor of zeste 12; EZH2, enhancer of zeste homolog 2.

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

up-regulated in many cancers (9). By contrast, microarray analyses in mice have demonstrated that *Pcl2* is highly expressed in undifferentiated embryonic stem cells and during embryonic development as well as in some adult tissues (8). PHF1, hPCL2, and hPCL3 are highly similar and display strong sequence similarities to *Drosophila* PCL. In particular, they share an N-terminal module consisting of three well defined functional domains, namely a TUDOR domain and two adjacent PHD (plant homeodomain) fingers immediately followed by a domain of extended homology with *Drosophila* PCL (8–10). These PCL proteins are not implicated in the formation and stability of the PRC2 complex in contrast with EED and SUZ12 but are essential for high levels of H3K27 trimethylation in *Drosophila* (11) and mammals (12, 13) as well as for the cell-specific targeting of PRC2 to specific loci such as some *Hox* genes (8, 14, 15).

HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) is a tumor suppressor gene frequently deleted or epigenetically silenced in many human cancers (16, 17). *HIC1* is a *bona fide* tumor suppressor because *Hic1*^{+/-} heterozygous mice have a high propensity to spontaneously develop tumors late in life (18). In addition, *HIC1* synergizes with P53 in tumor suppression (19). *HIC1* is a direct target of P53 and represses the transcription of *SIRT1*, a NAD⁺-dependent class III deacetylase that deacetylates and inactivates P53, thereby modulating P53-dependent DNA damage responses (20). Similarly, *SIRT1* and *HIC1* are also involved in a feedback regulatory loop with E2F1, a crucial activator of *SIRT1* transcription in response to DNA damage. E2F1 activates *HIC1* (21) and is inactivated by *SIRT1*-mediated deacetylation (22). Thus, *HIC1* is placed at the crossroads of complex regulatory loops modulating P53-dependent and E2F1-dependent cell survival, growth control, and stress responses (17, 23). In addition, *HIC1* is also essential for normal mammalian development as shown by *Hic1*^{-/-} homozygous mice, which together with a perinatal death have several developmental anomalies resembling those found in Miller-Dieker syndrome patients (24, 25).

HIC1 encodes a sequence-specific transcriptional repressor with five Krüppel-like C2H2 zinc fingers and two autonomous repression domains: the N-terminal BTB/POZ domain and its central region (16, 17, 26). To date, only 12 direct target genes supporting roles in development, cell cycle, and cell migration regulation have been described for *HIC1* (reviewed in Refs. 27–30). *HIC1* recruits different co-repressor complexes to its target genes through conserved small peptide motifs located in its central region, such as CtBP complexes through a GLDLSKK motif (31). In addition a SUMOylation/acetylation switch on lysine 314 embedded in the ψ K³¹⁴XEP motif in the *HIC1* central region regulates recruitment of the NuRD complex. Indeed, the interaction with MTA1, a component of the NuRD complex is regulated by these two competitive post-transcriptional modifications at lysine 314, promotion by SUMOylation, and inhibition by acetylation (27). So far, few *HIC1* target genes are known and its mechanisms of transcriptional repression are still poorly understood.

In this study, by yeast two-hybrid screening with the two repression domains of *HIC1* as bait (BTB-CR-LexA), we identified hPCL3 as a novel corepressor for *HIC1*. We show that

HIC1 interacts with the two hPCL3 isoforms, hPCL3L and hPCL3S, as well as with the related PHF1 paralog. *HIC1* recruits PRC2 independently of the CtBP and NuRD complexes, which interact with the *HIC1* central region, and we further demonstrate that this interaction mainly relies on its BTB/POZ domain. On the other hand, the common TUDOR domain and the hPCL3L-specific PHD2 domain are both involved in the interaction with *HIC1*. However, although both hPCL3L and hPCL3S isoforms interact with *HIC1* and EZH2, only hPCL3L favors the formation of a ternary complex with *HIC1* and PRC2 components. Consistent with these findings, we demonstrate that, in normal WI38 fibroblasts, *HIC1* recruits PHF1 and the PRC2 complex to some *HIC1* target genes such as *ATOH1* as well as the *EFNA1* and *CXCR7* promoters, as shown by the detection of high levels of H3K27 trimethylation and EZH2. Functional analyses using RNAi knockdown demonstrate that *HIC1* is necessary for the stable recruitment of EZH2 on *ATOH1* in WI38 and BJ-tert cells. Finally, *in vivo* during mouse cerebellar development, *ATOH1* repression by *HIC1* is associated with Polycomb-mediated epigenetic activity. In conclusion, our results identify *HIC1* as the first transcription factor in mammals able to recruit the repressive PRC2 complex to a discrete subset of target genes through its interaction with *Polycomb-like* proteins.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Two-hybrid Screen—Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics, Paris, France, as previously described (32). For bait cloning, the BTB-Central Region of *HIC1*(1–422) encompassing the two autonomous repression domains was PCR amplified and cloned in-frame with a C-terminal LexA DNA-binding domain in a yeast two-hybrid vector. A human breast tissue random-primed cDNA library, transformed into the Y187 yeast strain and containing 10 million independent fragments, was used for mating. The screen was performed in conditions ensuring a minimum of 50 million interactions tested, to cover five times the primary complexity of the yeast-transformed cDNA library. 79 million interactions were actually tested with *HIC1*.

Cell Culture—WI-38 were purchased from ATCC (14 passages) and cultured in minimal essential medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), nonessential amino acids, and gentamicin. HEK293T cells were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, gentamicin, and nonessential amino acids. BJ-tert cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS and penicillin/streptomycin.

Plasmids and shRNA Retroviral Infections—The pTL1-*HIC1*, pcDNA3-FLAG-*HIC1*, pcDNA3-FLAG-*HIC1* L225A, K314R, E316A, and K314Q expression vectors as well as BTB-Gal4-NLS-HA and BTB-CR-Gal4-NLS-HA *HIC1* chimeras have been previously described (31, 33). The expression vectors for full-length FLAG-hPCL3L and FLAG-hPCL3S or for their isolated domains (10), as well as for Myc-EZH2 (34), HA-EED, and HA-SUZ12 (35, 36) have been previously described.

We PCR amplified and cloned a fragment corresponding to full-length PHF1 and amino acids 2–240 (containing the TUDOR and the two tandem PHD domains) of PHF1 flanked

by BamHI and EcoRI restriction sites into pcDNA3-FLAG. All constructs were verified by sequencing. shRNA were cloned in the pSuperRetro vector according to the manufacturer's instructions using previously published sequences targeting PHF1 (12) and HIC1 (37). BJ-tert cells were infected with retrovirus encoding shRNA as previously described (30) for 24 h, fresh medium was added for 24 h and infected cells were selected for 48 h by puromycin treatment at 2 μ g/ml.

Antibodies—Rabbit polyclonal anti-HIC1 (325 and 2563) antibodies (31), the monoclonal antibodies against EZH2 (AC22), EED (AA19), and Bmi1 (AF27) (35, 36), and the polyclonal antibodies against the C-terminal end of hPCL3L (10) have been previously described. For HIC1 immunoblotting shown in Figs. 1E, 8E, 9A, and 10A, we used a new batch of polyclonal antibodies obtained by injecting a synthesized peptide corresponding to the C-terminal end of HIC1 into New Zealand rabbits (Eurogentec, Seraing, Belgium). Similarly, to generate polyclonal antibodies against PHF1, two peptides were synthesized and used to immunize two New Zealand rabbits. Their sequences are (amino acids 360–374) H2N-CGV SRP LGK RRR PEP E-CONH2 and (amino acids 312–327) H2N-HKD RFI SGR EIK KRK C-CONH2. Commercial antibodies of the following specificity were used: FLAG from Sigma (M2 monoclonal antibody F3165); GAL4 (sc-577), ACTIN (sc-1616-R), GAPDH (sc-32233), and MYC tag (sc-789) were from Santa Cruz; HA (mouse monoclonal from BABCO); anti-Suz12 (D39F6) from Cell Signaling; anti-H3K27me3 (07-449) and anti-acetyl Histone H3 (06-599) from Upstate; anti-H3K27me2 (39245) from Active motif; anti-Histone H3 (ab1791) from Abcam.

Transfection and Co-immunoprecipitation Assays—Cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the polyethylenimine method using ExGen 500 (Euromedex), as previously described (10). Cells were transfected for 6 h and then incubated in fresh complete medium. For co-immunoprecipitation assays, 48 h after transfection, cells were rinsed twice in ice-cold PBS and lysed in ice-cold IPH buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, and 1 \times protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)). Cell lysates were cleared by centrifugation (20,000 \times g, at 4 $^{\circ}$ C for 30 min). The supernatants were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with 2 μ g of antibody. Then, protein A/G-Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added for 30 min. The beads were washed 3 times with IPH buffer. Proteins were eluted by boiling in Laemmli loading buffer and separated by SDS-PAGE (8, 12, or 15%) before Western blotting.

Sequential co-immunoprecipitation were performed essentially as described above. Briefly, after a first round of immunoprecipitation with FLAG antibodies coupled to agarose beads (Sigma), FLAG-HIC1 and associated proteins were eluted with 100 μ l of a FLAG peptide/TBS (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) solution according to the manufacturer's instructions. 900 μ l of IPH buffer were then added and subjected to a second immunoprecipitation with anti-hPCL3L antibody. Co-immunoprecipitation analyses of endogenous proteins associated with chromatin in normal WI-38 fibroblasts and HEK293T transiently transfected with FLAG-HIC1 were performed as previously described (10) or as described above, except that the

lysates were extensively sonicated before the clearing centrifugation step.

Western Blot—Western blots were performed as previously described (10, 31). The secondary antibodies were horseradish peroxidase-linked antibodies raised against rabbit or mouse immunoglobulins (Amersham Biosciences).

Small Interfering RNAs—WI-38 cells were reverse-transfected with RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions using 20 nM small interfering RNA targeting HIC1 (HIC1 siGENOME Smart Pool M-006532-01, Dharmacon), EZH2 (siGENOME Smart Pool M-004218-03), or a scrambled sequence. 72 h later cells were harvested for protein, RNA, or chromatin extraction. In Fig. 10, cells were incubated for 6 days using 5 nM small interfering RNA.

Chromatin Immunoprecipitation—Conventional ChIP and sequential ChIP were performed as previously described (10). The purified DNAs were used for PCR analyses with Fast Start TaqDNA Polymerase (Roche Applied Science) using the relevant primers for ATOH1 and GAPDH (supplemental Table S1).

Quantitative ChIP was performed according to the Q² ChIP protocol as previously described with slight modifications (38). Briefly, formaldehyde was added directly to the cultured cells to a final concentration of 1% for 15 min at 37 $^{\circ}$ C. Adding glycine to a final concentration of 0.125 M stopped the cross-linking. After 5 min at 37 $^{\circ}$ C, cells were lysed directly in the plates by resuspension in cell lysis buffer for 5 min. Then, the samples were pelleted, resuspended in nuclei lysis buffer, and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a BioRuptor (Diagenode, Liege, Belgium). Whole postnatal day 5 (P5) mice cerebella (C57BL/6 background) were immersed in 1% formaldehyde in PBS for 2.5 h on ice, whereas P21 cerebella (C57BL/6 background) were first cut into 4 pieces. Glycine was added to 250 mM and incubated for 5 min at room temperature. After washing with PBS, samples were extensively resuspended in 500 μ l of cell lysis buffer, incubated 10 min on a rotator at 4 $^{\circ}$ C, and centrifuged. Pellets were then resuspended in 200 μ l of nuclei lysis buffer, separated into two tubes, and sonicated with 9 sets of 30-s pulses using a BioRuptor at the highest power. Chromatin was diluted to a concentration of 1.5 A_{260} units in RIPA buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 140 mM NaCl). Chromatin (100 μ l, 1.5 A_{260} units) was transferred to a tube containing 2.4 μ g of antibody-magnetic protein A-coated bead (Millipore) complexes in 100 μ l of RIPA buffer and incubated overnight on a rotator at 4 $^{\circ}$ C. Immune complexes were washed three times in ice-cold RIPA buffer and once in TE buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA). Each wash lasted for 4 min on a rotator at room temperature. ChIP complexes were transferred to a new tube with TE buffer, which was removed and replaced by 150 μ l of elution buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1% SDS) containing 50 μ g/ml of proteinase K and incubated 1 h at 55 $^{\circ}$ C. Then samples were treated with 133 μ g/ml of RNase A for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Finally, the supernatant was recovered and incubated for 2 h at 68 $^{\circ}$ C. DNAs as well as 5% input (5 μ l of 1.5 A_{260} units) were purified on Nucleobond Extract II (Macherey-Nagel) and eluted with 150 μ l of H₂O. The protocol involving mouse use was per-

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

formed in accordance with the National and European regulation on the protection of animals used for scientific purposes.

RT-PCR and Quantitative PCR—RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR were performed as previously described (10).

Immunoprecipitated DNA was analyzed in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) in triplicates by real time PCR starting from 3 μ l of template DNA in a final volume of 10 μ l containing power SYBR Green (Applied Biosystems) and primers at a final concentration of 0.5 μ M. The primers used are summarized in supplemental Table S1. According to a melting point analysis, only one PCR product was amplified under these conditions. An input control was used to generate a standard curve for each gene. Results were expressed as % input for EZH2 and as a ratio of total histone H3 for acetyl-H3, H3K27me3, and H3K27me2. Each condition was performed twice and a representative experiment is shown.

Statistics—Experiments were performed at least twice independently in duplicates or triplicates. Statistical analyses were performed by Student's *t* test. The asterisk (*) indicates $p < 0.05$.

RESULTS

HIC1 Interacts with hPCL3L and PHF1—To further characterize the repression mechanisms brought about by HIC1 on its target genes, we conducted a yeast two-hybrid screen using the two autonomous repression domains of HIC1, the BTB/POZ domain and the central region, as bait to screen a human mammary gland library (Fig. 1A). As previously described, this screen has already identified in addition to CtBP, ARID1A/BAF250A, a component of the SWI/SNF complexes and MTA1, a component of the NuRD repressive complexes as new HIC1 partners (27, 32). In addition, seven interacting clones corresponded to the N-terminal half (amino acids 32–361) of hPCL3 (human Polycomb-like 3), one of the three human orthologs of the *Drosophila* PCL (Polycomb-like) protein (9). The isolated preys contained the TUDOR domain, the two plant homeodomain (PHD) fingers, and the domain of extended homology with *Drosophila* PCL demonstrating that they corresponded to the longest isoform of hPCL3, hPCL3L (9, 10) (Fig. 1A). Because hPCL3 is functionally linked to the PRC2 Polycomb repressive complexes (10), we decided to further study this potential new HIC1 interacting protein.

To confirm this interaction, we first performed coimmunoprecipitation analyses in transiently transfected HEK293T cells. HIC1 was coprecipitated by FLAG-hPCL3L (Fig. 1B) and conversely, FLAG-hPCL3L was coimmunoprecipitated by HIC1 (Fig. 1C) demonstrating that full-length HIC1 and hPCL3 associate *in vivo*. Furthermore, as shown in Fig. 6B, FLAG-HIC1 proteins can efficiently co-immunoprecipitate endogenous hPCL3L in HEK293T.

The *Drosophila* PCL has three human homologues, PHF1 (hPCL1), hPCL2, and hPCL3, which exhibit distinct expression patterns (8, 9). However, these three homologues are highly related notably for the presence of the TUDOR and tandem PHD domains. Previously, we demonstrated through quantitative RT-PCR analyses that PHF1 but not hPCL3 is highly expressed together with HIC1 in normal human WI38 fibroblasts (10). Because these WI-38 cells are a convenient model to

study the functional properties of endogenous HIC1 proteins (20, 27), we asked whether HIC1 could also interact with PHF1. As expected from their common structural organization, HIC1 was coimmunoprecipitated by FLAG-PHF1 (Fig. 1D) and conversely FLAG-PHF1 was coprecipitated by HIC1 (Fig. 1E). According to our previous results of qRT-PCR in mammary HMEC-hTERT and MCF10A cells (10), PHF1 appeared less expressed than hPCL3L in the human mammary gland, the tissue used to construct the library for the yeast two-hybrid screen. This result could at least partly explain why PHF1 was not initially identified as a potential HIC1 partner. Thus, our results demonstrate that HIC1 interacts with two Polycomb-like proteins, hPCL3 and PHF1.

HIC1 Recruits hPCL3L via Its BTB/POZ Domain and Independently of CtBP and NuRD Complexes—The bait used in the two-hybrid screen included the two repression domains of HIC1, the BTB/POZ domain and the central region (CR) in-frame with a C-terminal DNA-binding domain to mimic the structure of the wild-type HIC1 protein. The CtBP and MTA1 corepressors isolated in this screen clearly interact with the central region, respectively, through the GLDLSKK motif and the MKHEP SUMOylation/acetylation switch motif (Fig. 1A) (27, 31, 33).

The CtBP and NuRD repression complexes have been linked, respectively, to the recruitment of PcG proteins and to the deposit of its specific epigenetic mark, H3K27me3 (39–41). To investigate a potential link in the case of HIC1, we performed co-immunoprecipitation analyses between hPCL3L and HIC1 point mutants compromised in their ability to interact with these two complexes. The HIC1 L225A mutant carries a point mutation in the GLDLS motif that abrogates its interaction with CtBP (42). Several point mutants in the SUMOylation/acetylation switch motif MK³¹⁴HEP severely impaired the interaction between HIC1 and MTA1, a component of the NuRD complex (27). The CtBP-deficient mutant displayed an ability to interact with hPCL3L comparable with its wild-type counterpart (Fig. 2A). Similarly, neither the SUMOylation-deficient mutants K314R and E316A nor the K314Q mutant mimicking a constitutive acetylation showed significantly reduced binding to hPCL3L compared with wild-type HIC1 (Fig. 2B).

We thus hypothesize that the BTB/POZ domain could be the HIC1 repression domain implicated in the interaction with hPCL3L. To that end, we used BTB- and BTB-CR-Gal4 chimeras including a nuclear localization signal (NLS) and an HA epitope, as previously described (33) (Fig. 3A). The isolated central region cannot be tested in this experimental setting due its conformational problems in the absence of the BTB/POZ domain (31). In transient transfection assays, the BTB-CR-Gal4 chimera interacts with hPCL3L in close agreement with the yeast two-hybrid screen (Fig. 3B, lane 5). Interestingly, a strong interaction was also detected with the isolated BTB/POZ domain (Fig. 3B, lane 4). In contrast with the related BTB/POZ domains of BCL6 and PLZF, the HIC1 BTB/POZ domain is an HDAC-independent repression domain insensitive to inhibitors of Class I and II HDACs such as TSA (43). Aside from the Class III deacetylase SIRT1 (20), hPCL3L is therefore only the second protein described so far as interacting with the HIC1 BTB/POZ domain. These observations indicate that HIC1 can

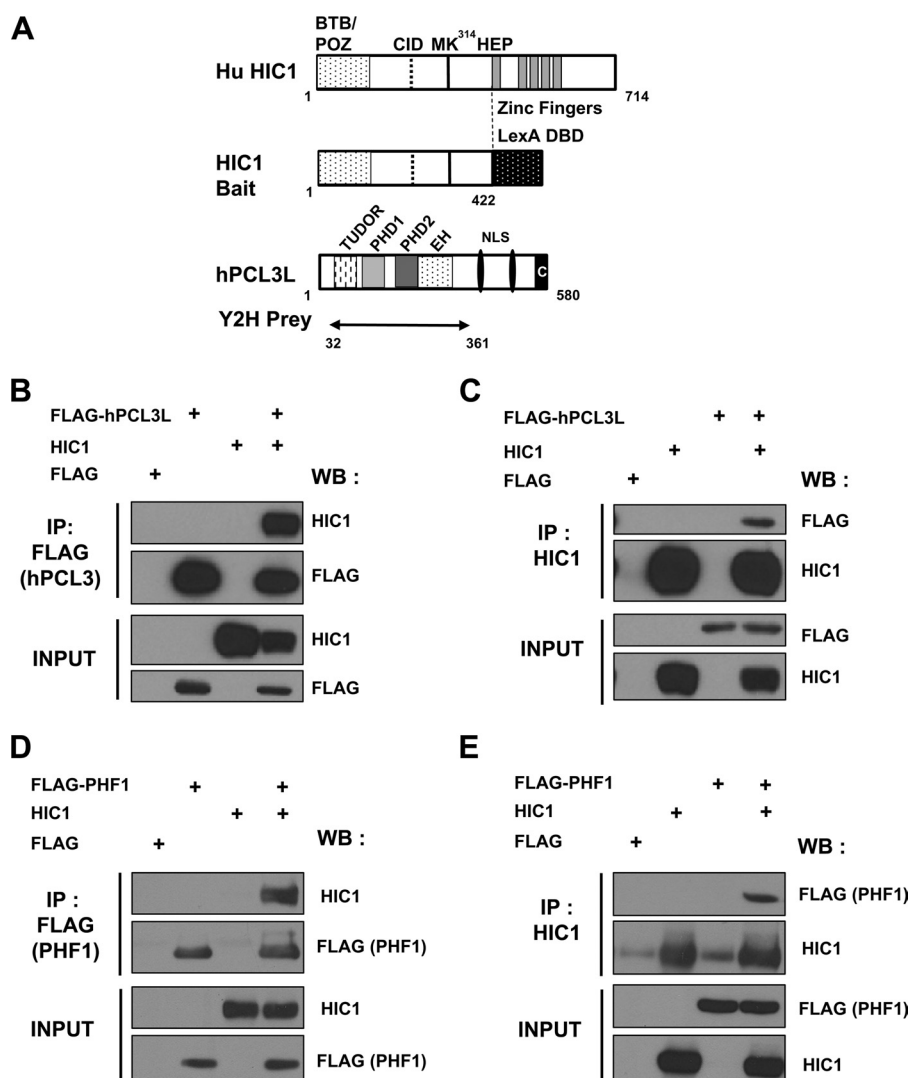


FIGURE 1. HIC1 interacts with hPCL3 and its paralogue PHF1 (PHD finger protein 1). *A*, schematic drawing of the human HIC1 and hPCL3L (human Polycomb-like 3) proteins. The BTB/POZ domain, the central region containing the evolutionarily conserved CtBP-interaction domain (CID) (31), the acetylation/SUMOylation switch motif (μ K³¹⁴XEP) (27, 33), and the 5 C₂H₂ zinc fingers are shown. The fragment of HIC1 used as the bait for two-hybrid screening of a human mammary gland cDNA library included the two autonomous repression domains of HIC1 (amino acids 1–422). The BTB/POZ domain and the central region were fused in-frame with a C-terminal LexA DNA-binding domain (DBD) to mimic the HIC1 protein. The longest isoform of human Polycomb-like 3 protein, hPCL3L (Q5T6S3: 580 amino acids), is shown below. The domains conserved within the human Polycomb-like family are boxed, including the conserved TUDOR, plant homeodomain (PHD1), and PHD2 domains, the PCL extended homology domain (EH) and a C-terminal Chromo-like domain (C) (9, 10). Two predicted NLS are shown as black ovals. The isolated prey corresponds to amino acids 32–361 of hPCL3L. *B*, HIC1 interacts with hPCL3L. HEK293T cells were transfected for 48 h with the indicated expression plasmids as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-FLAG antibodies, and immunoblotted (WB). The relevant pieces of the membranes were incubated with polyclonal antibodies against HIC1 to detect co-immunoprecipitation (IP) or with anti-FLAG monoclonal antibodies to ascertain the presence of hPCL3L (IP: FLAG). 2% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (INPUT). *C*, hPCL3L interacts with HIC1. The reciprocal experiment was performed in HEK293T cells with the same combinations of expression plasmids but using the polyclonal anti-HIC1 antibodies for the immunoprecipitation step. *D*, HIC1 interacts with PHF1. HEK293T cells were transiently transfected for 48 h with the indicated expression plasmids. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-FLAG antibodies (top panels, IP FLAG (PHF1), first to fourth lanes) and immunoblotted (WB) with polyclonal antibodies against HIC1 to detect co-immunoprecipitation. The membrane was then stripped and re-probed with anti-FLAG monoclonal antibodies to ascertain the presence of PHF1. 2% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (bottom panels: INPUT). *E*, PHF1 interacts with HIC1. The reciprocal experiment was performed in HEK293T cells with the same combinations of expression plasmids but using polyclonal anti-HIC1 antibodies for the immunoprecipitation step. Note that the new batch of antibodies used in this experiment is able to detect the weak amount of endogenous HIC1 proteins present in HEK293T after a first HIC1 immunoprecipitation.

recruit independently three distinct repression complexes through its BTB/POZ domain and central region.

The Two hPCL3 Isoforms Interact with HIC1 via Their TUDOR and PHD2 Domains—The full-length hPCL3L protein contains a TUDOR domain and two tandem zinc finger-like PHD domains, PHD1 and PHD2, which were all included in the isolated prey (Fig. 1A). The hPCL3 gene also encodes a shorter isoform, which contains only the TUDOR and PHD1 domains

(Fig. 4A) (9). In transient transfection assays, HIC1 is co-immunoprecipitated by this shorter isoform (Fig. 4B). To determine which domain is responsible for the interaction with HIC1, we conducted co-immunoprecipitation assays between HIC1 and our previously described FLAG-tagged deletion mutants (Fig. 4A) (10). As shown in Fig. 4C, a strong interaction was detected between HIC1 and the N-terminal half of hPCL3L containing the TUDOR domain (lane 3) or with the isolated PHD2 domain

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

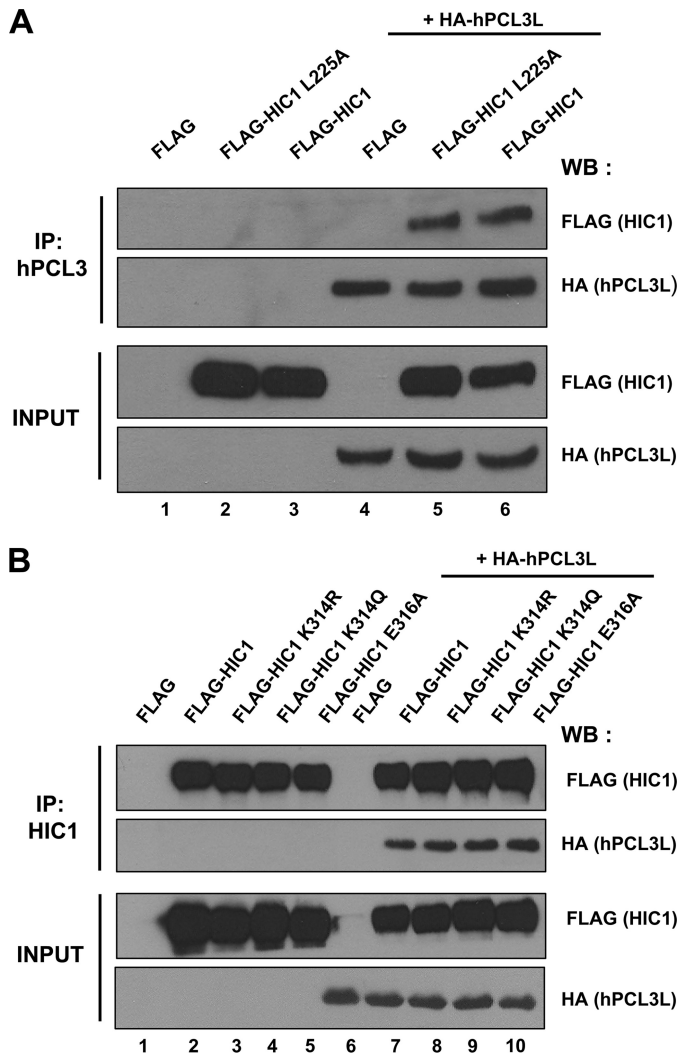


FIGURE 2. HIC1 recruits hPCL3L independently of the CtBP and NuRD complexes. *A*, the HIC1 L225A mutant that is unable to interact with CtBP recruits hPCL3L as efficiently as wtHIC1. HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combination of FLAG- and HA-tagged versions of HIC1 and hPCL3L as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. Whole cell extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-hPCL3L antibodies (*IP: hPCL3L*, lanes 1–6) and immunoblotted (*WB*) with anti-FLAG antibodies to detect co-immunoprecipitation of HIC1 (*top panel*). The blot was then stripped and probed with anti-HA to verify the presence of hPCL3L in the relevant immunoprecipitates (*second panel*). 2% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and successively immunoblotted with anti-FLAG and anti-HA antibodies (*INPUT*, two bottom panels, lanes 1–6). *B*, the acetylation/SUMOylation switch on lysine 314 does not regulate the interaction with hPCL3L. The various SUMOylation-deficient mutants K314R and E316A as well as the K314Q mutant mimicking a constitutive acetylation have been previously described (27). They were used together with the HA-hPCL3L and the empty pcDNA3-FLAG vector as control in a co-immunoprecipitation experiment as described above.

(lane 5). By contrast, a very weak interaction was detected between HIC1 and the C-terminal half of hPCL3S containing the PHD1 domain (Fig. 4C, lane 4). Notably, the PHD1 domain is poorly conserved in the phylogeny of PCL3 proteins in striking contrast with the TUDOR and PHD2 domains (10). In accordance with a conserved mechanism of interaction between HIC1 and Polycomb-like proteins, a truncated form of PHF1 containing its TUDOR, PHD1, and PHD2 domains was sufficient to co-immunoprecipitate HIC1 (Fig. 4D).

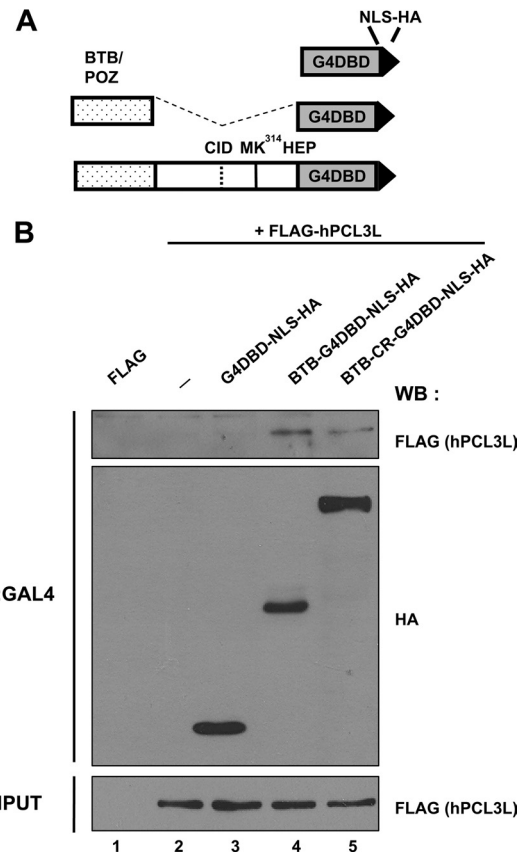


FIGURE 3. The HIC1 BTB/POZ domain interacts with hPCL3L. *A*, schematic representation of the various Gal4DBD-NLS-HA chimeras. *B*, association of hPCL3L with HIC1 is dependent on the BTB/POZ domain. HEK293T cells were transiently transfected with the indicated expression plasmids as well as with the empty Gal4DBD-NLS-HA vector as a control for 48 h. Whole cell extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-GAL4 antibodies (*top panels*, IP GAL4, lanes 1–5) and immunoblotted (*WB*) with anti-HA monoclonal antibodies to verify the presence of the HIC1-Gal4 chimeras in the immunoprecipitates and with antibodies against the FLAG epitope to detect hPCL3L co-immunoprecipitation. 2% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against FLAG to ascertain the presence of hPCL3L (*bottom panel: Input*, lanes 1–5).

In conclusion, these results demonstrate that both the TUDOR and PHD2 domains are required for the interaction with HIC1. Notably, these two domains interacting with HIC1 are also involved in the interaction with EZH2 (10).

hPCL3L Favors Formation of a Ternary Complex with HIC1 and PRC2 Complex—We finally decided to clarify the role of these interactions between HIC1 and Polycomb-like proteins. Although they contain different combinations of functional domains, the two hPCL3 isoforms interact both with HIC1 (Figs. 1B and 4B) and EZH2 and EED, two components of PRC2 complexes (10). Nevertheless, hPCL3L and hPCL3S display different subcellular localizations and are present in two different EZH2 containing complexes as previously shown by gel filtration analyses (10). These observations prompted us to investigate whether both hPCL3 isoforms could form a “ternary” complex with HIC1 and components of the PRC2 complex. In a preliminary experiment, the three components necessary to obtain a stable PRC2 complex, EZH2, EED, and SUZ12, were cotransfected together with HIC1 and with or without each of the two hPCL3 isoforms. HIC1 proteins were immunoprecipitated with FLAG antibodies and their associated proteins were

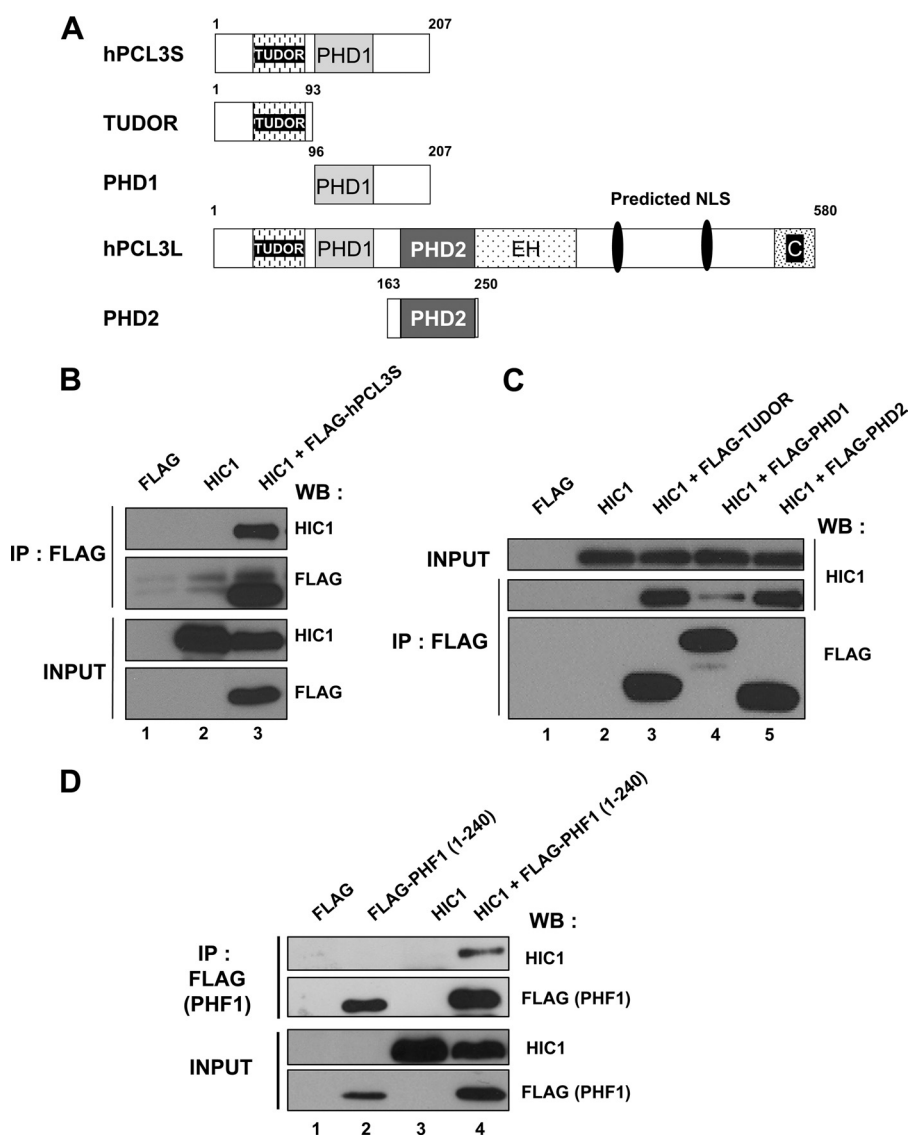


FIGURE 4. HIC1 interacts with the two hPCL3 isoforms, hPCL3L and hPCL3S, via their conserved TUDOR and PHD2 domains. *A*, schematic representation of the hPCL3L and hPCL3S isoforms and deletion mutants used. *B*, HIC1 also interacts with the hPCL3S isoform. HEK293T cells were transfected for 48 h with the indicated expression plasmids as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer, incubated with anti-FLAG antibodies and immunoblotted (WB). The relevant pieces of the membranes were incubated with polyclonal antibodies against HIC1 to detect co-immunoprecipitation (IP) or with anti-FLAG monoclonal antibodies to ascertain the presence of hPCL3S (IP: FLAG). 2% of each lysate were directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies (INPUT). *C*, association of HIC1 with hPCL3 is dependent on the TUDOR and PHD2 domains. HEK293T cells were transiently transfected with the indicated expression plasmids as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control for 48 h. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-FLAG antibodies (two bottom panels: IP FLAG, lanes 1–5) and immunoblotted (WB) with anti-HIC1 antibodies to detect HIC1 co-immunoprecipitation (middle panel) and with anti-FLAG monoclonal antibodies to verify the presence of hPCL3 deletion mutants in the immunoprecipitates (bottom panel). 2% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against HIC1 to ascertain the presence of HIC1 (top panel: INPUT). *D*, HIC1 interacts with the N-terminal moiety of PHF1. A similar co-transfection experiment was performed in HEK293T cells with a similar combination of expression plasmids but using the FLAG-PHF1 encoding amino acids 1–240 corresponding to the conserved functional domains.

detected with HA and MYC antibodies. Our results demonstrate that hPCL3L, but not the hPCL3S isoform lacking the PHD2 domain, promotes interactions between HIC1 and two PRC2 components, EZH2 and SUZ12 (Fig. 5, compare lanes 6–8). The strong and constant interaction observed with EED (lanes 6–8) could be explained by the interaction between EED and the C-terminal moiety of HIC1 containing the 5 zinc finger motifs (supplemental Fig. S1).

To unambiguously demonstrate that hPCL3L, HIC1, and the PRC2 complex are engaged into a ternary complex, FLAG-HIC1, HA-hPCL3L, and PRC2 components (MYC-EZH2, HA-SUZ12, and HA-EED) were cotransfected in HEK293T cells

and we performed two rounds of sequential immunoprecipitation (44). The cell lysates were first immunoprecipitated with FLAG antibodies coupled to agarose beads and the immunoprecipitated proteins were eluted with an excess of FLAG peptide. Then, this eluate was subjected to a second immunoprecipitation step using the polyclonal antibodies directed against hPCL3L (10). Finally, the proteins immunoprecipitated in this second round were analyzed by Western blot with the HA (for SUZ12, hPCL3, and EED), MYC (for EZH2), and HIC1 antibodies. As shown in Fig. 6A, we detected a specific ternary complex containing all these proteins (lane 8).

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

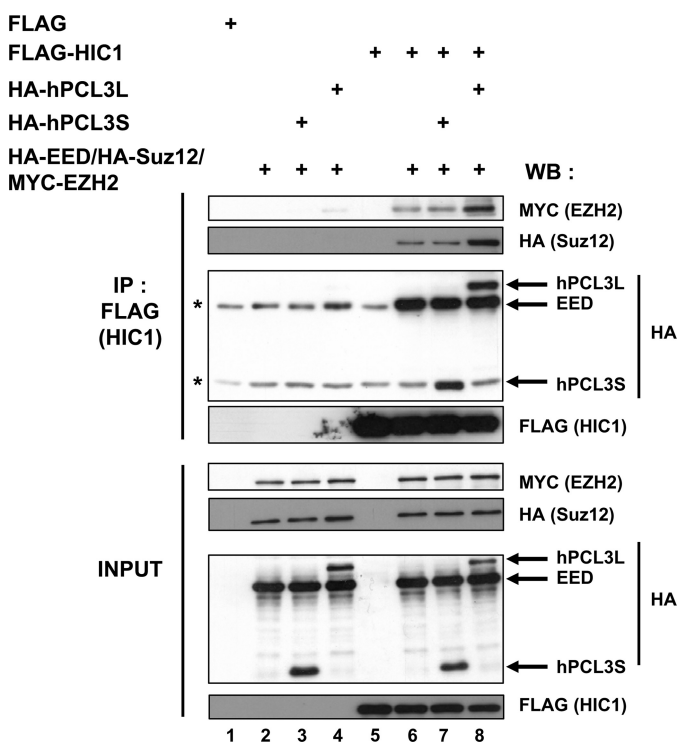


FIGURE 5. hPCL3L but not hPCL3S promotes the interaction between HIC1 and members of the PRC2 complex. HEK293T cells were transiently transfected with the indicated expression plasmids as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control for 48 h. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-FLAG antibodies (*top four panels*, IP: FLAG (HIC1), lanes 1–8) and immunoblotted (WB) with anti-FLAG monoclonal antibodies to verify the presence of HIC1 in the immunoprecipitates (IP) and with antibodies against the MYC and HA epitope to detect co-immunoprecipitation, respectively, of EZH2 and Suz12, EED, hPCL3L, and hPCL3S. 2% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the same antibodies to ascertain the presence of the relevant expression vectors in each transfection condition (*bottom four panels*: INPUT, lanes 1–8).

In accordance with these results, upon ectopic expression in HEK293T, FLAG-HIC1 proteins could efficiently co-immunoprecipitate hPCL3L as well as several endogenous PRC2 components including Suz12, Eed, and EZH2, the catalytic subunit of PRC2 complexes, but not the PRC1 component Bmi1 (Fig. 6B). In addition, we were able to detect an interaction between the endogenous HIC1 and Suz12 proteins in WI-38 fibroblasts (Fig. 6C). In conclusion, our results suggest that Polycomb-like proteins, and especially hPCL3L, can stabilize interactions between HIC1 and PRC2 components through the formation of a ternary complex.

EZH2 and H3K27 Trimethylation Are Associated with a Subset of HIC1 Target Genes—We then examined if these interactions could result in a functional activity of Polycomb complexes on HIC1 target genes. To that end, we assessed by ChIP-qPCR analyses the levels of two epigenetic marks and the histone methyltransferase EZH2 on various HIC1 target genes in WI-38 cells. The histone modification H3K27me₃, specifically catalyzed by PRC2, was detected on canonical PRC2 target genes such as *MYT1*, *CCND2*, and the *ATOH1* enhancer as expected (45), but also on *CXCR7* (37) and *EFNA1* (46), two HIC1 target genes that had not been previously recognized as PRC2 targets (Fig. 7A). The *ATOH1* enhancer is a direct target gene of HIC1 in mouse embryonic cerebellum and in human

medulloblastoma cell lines (47) as well as in normal WI-38 fibroblasts (27). Interestingly, *ATOH1* is also found in a list of genes repressed by PRC2 components in TIG3 human embryonic fibroblasts (45). By contrast, no consistent level of H3K27me₃ modification was detected on other HIC1 target genes such as *CCND1*, the distal sites in the *SIRT1* promoter and *E2F1*, or on the *GAPDH* promoter used as negative control. Previously, we detected through ChIP analyses followed by PCR amplification the presence of H3K27me₃ on the proximal HIC1 binding sites in the *SIRT1* promoter (27). However, due to the extremely high GC content of this region, we failed to amplify it in our quantitative ChIP-qPCR assays (data not shown).

In accordance with H3K27me₃ detection, EZH2 was highly detected on *MYT1*, *ATOH1*, and *EFNA1* but at lower levels on *CCND2* and *CXCR7* (Fig. 7B). Surprisingly, despite the absence of H3K27me₃, significant levels of EZH2 were also detected on the distal *SIRT1* promoter (Fig. 7B).

We next assessed by ChIP the levels of an activating epigenetic mark on the same subset of genes. As shown in Fig. 7C, the levels of H3K27me₃ are globally inversely mirrored on each gene by the levels of total acetylated histone H3. In conclusion, several HIC1 target genes are enriched in H3K27me₃ histone modification and the PRC2-methyltransferase EZH2 in close agreement with the interaction between HIC1, Polycomb-like proteins, and PRC2.

HIC1 Recruits PHF1 and PRC2 Complex to ATOH1 Enhancer in WI-38 Cells—We next wanted to investigate the relationship between HIC1, human Polycomb-like proteins, and PRC2 complex at an endogenous target locus. To demonstrate that *ATOH1* is indeed a target gene common to the HIC1 and PRC2 complexes, we carried out single ChIP experiments in growing WI-38 cells. As shown in Fig. 8A, HIC1 is found at the *ATOH1* enhancer together with the H3K27me₃ epigenetic mark specifically deposited by the PRC2 complex. However, we failed to detect any enrichment for hPCL3L. This result suggests that our hPCL3L antibodies, although suitable for ChIP after transient transfection of hPCL3L (data not shown) might not be suitable for ChIP analyses of endogenous proteins. Another explanation could be the relatively low level of hPCL3L mRNAs previously detected by qRT-PCR analyses of WI-38 cells (10). Indeed, hPCL3 seems preferentially overexpressed in many cancers (9). Therefore, we investigated the binding of PHF1, which interacts with HIC1 (Fig. 1D) and which, by contrast with hPCL3, is strongly expressed in WI-38 cells (10). As expected from all our results, we detected PHF1 bound to the *ATOH1* enhancer together with HIC1 and H3K27me₃ (Fig. 8B). In addition, these ChIP analyses also demonstrated the binding of EZH2, the catalytic component of PRC2, as well as of Bmi1, a core component of PRC1 to the *ATOH1* enhancer. As control, neither H3K27me₃ nor any of these proteins were detected on the *GAPDH* promoter (Fig. 8B).

To further confirm that HIC1 recruits PHF1 to the *ATOH1* enhancer, we performed sequential ChIP experiments as previously described (27). Chromatins prepared from WI-38 cells were immunoprecipitated with HIC1 antibodies followed by PHF1 antibodies or rabbit IgG as negative control. As shown in Fig. 8C (*left panel*), a PCR-amplified band was obtained only for

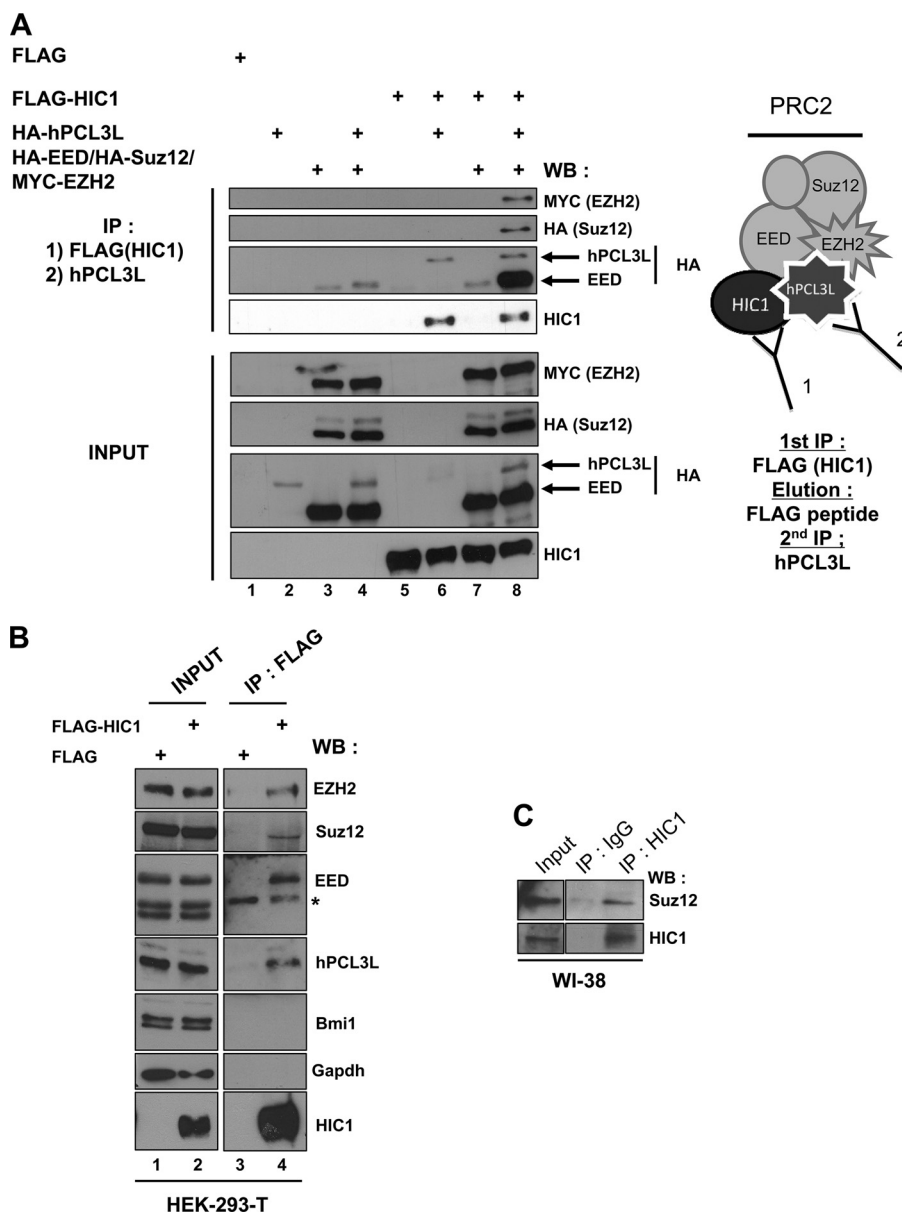


FIGURE 6. HIC1 forms a ternary complex with hPCL3L and PRC2. The sequential immunoprecipitation (IP) protocol is schematically drawn. HEK293T cells were transiently transfected with the indicated combination of FLAG-HIC1, MYC-EZH2, and HA-tagged versions of hPCL3L, Suz12, or EED as well as with the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. Whole cells extracts were prepared in IPH buffer and incubated with anti-FLAG antibodies coupled to agarose beads (IP: FLAG, lanes 1–8). After washings, the beads were incubated with excess FLAG peptide to elute the immunoprecipitated materials, which were then subjected to a second round of immunoprecipitation with anti-hPCL3L antibodies recognizing the transitory expressed but not the endogenous proteins. These immunoprecipitates were immunoblotted (WB) with anti-MYC, anti-HA, and anti-HIC1 antibodies to detect the formation of the ternary complex in the relevant immunoprecipitates (top four panels, lanes 1–8). 2% of each lysate was directly resolved by SDS-PAGE and successively immunoblotted with anti-MYC, anti-HA, and anti-HIC1 antibodies (INPUT, bottom four panels, lanes 1–8). B, co-immunoprecipitation analyses of chromatin-associated proteins. HEK293T cells were transfected transiently with the expression vector for FLAG-tagged HIC1 or the empty pcDNA3-FLAG vector as a control. The chromatin-associated fractions were prepared as previously described (10) and incubated with anti-FLAG antibodies. 2% of each nuclear fraction (INPUT, lanes 1 and 2) and the immunoprecipitates (IP: FLAG, lanes 3 and 4) were directly resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Relevant pieces were immunoblotted (WB) with monoclonal anti-EZH2, EED, Bmi1, and GAPDH or polyclonal anti-hPCL3L (10) and Suz12 antibodies to detect co-immunoprecipitation of these endogenous proteins with exogenous FLAG-HIC1 (top two panels (IP: FLAG), lanes 3 and 4). As control the blot was also probed with anti-FLAG to verify the presence of HIC1 in the INPUT and in the relevant immunoprecipitate (bottom panels, lanes 2 and 4). C, co-immunoprecipitation of endogenous Suz12 proteins by HIC1 in normal WI-38 fibroblasts.

HIC1/PHF1 on the *ATO1H1* enhancer. As control, similar results were obtained when we carried out the sequential ChIP with the PHF1 antibodies first (Fig. 8C, right panel) and no signal was obtained for the *GAPDH* promoter. In conclusion, these results demonstrate that HIC1 might form a stable complex with PHF1 on the *ATO1H1* enhancer, which is also co-occupied by PRC2 and PRC1 components.

To directly link the interaction between HIC1 and PHF1 to recruitment of the PRC2 complex, we assessed the levels of EZH2, H3K27me3, and of total acetylated H3 on a subset of target genes in WI-38 cells transfected with siRNA targeting HIC1 or control siRNA. In these cells, protein levels of HIC1 were almost completely extinguished, whereas the total levels of EZH2, H3K27me3, and histone H3 appeared globally unaf-

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

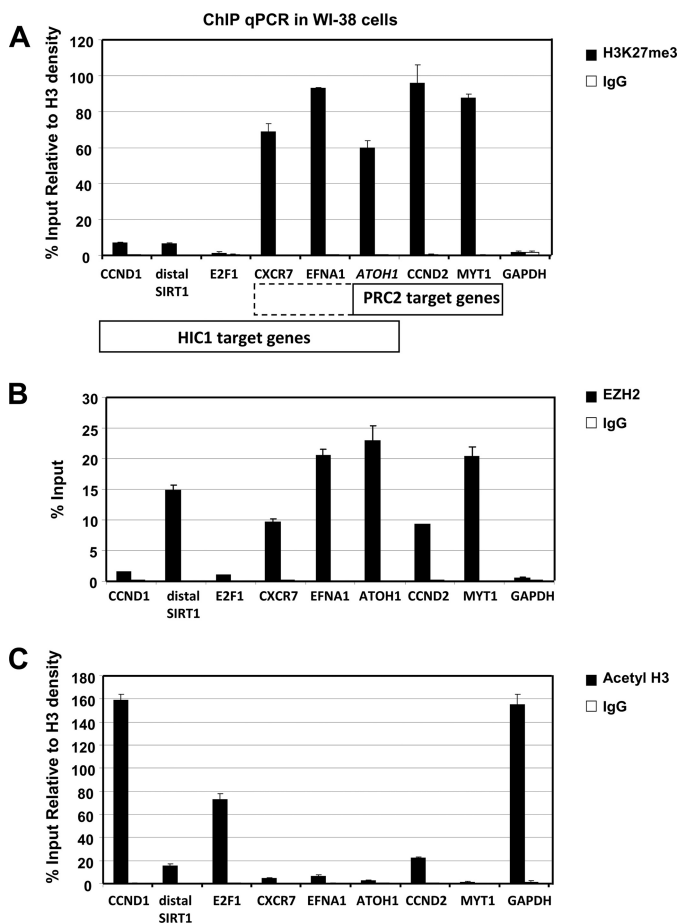


FIGURE 7. A subset of HIC1 target genes is associated with H3K27 trimethylation and EZH2. Levels of H3K27 trimethylation (A), EZH2 (B), and total acetylated H3 (C) of various genes were analyzed by ChIP-qPCR in WI-38 fibroblasts. The genes analyzed are arranged in three groups: HIC1 target genes (CCND1, SIRT1-distal HiRE sites-, E2F1, CXCR7, EFNA1, and ATOH1), Polycomb target genes (ATOH1, CCND2, and MYT1), and a housekeeping gene as control (GAPDH). The dotted box highlights CXCR7 and EFNA1, which have been identified as potential PRC2 target genes in this study due to the presence of H3K27me3 and EZH2. Enrichments for each modification were assessed by quantitative real-time PCR in triplicate. A representative experiment is shown.

affected (Fig. 8E). We carried ChIP analyses on MYT1 as a canonical PRC2 target and on two HIC1 target genes enriched in H3K27me3 and EZH2, EFNA1 and ATOH1, as well as on GAPDH as non-binding control (Fig. 7). For ATOH1, besides the enhancer sequence we also included in our assays three regions in its promoter containing consensus HIC1 binding sites (Fig. 8D) because a genome-wide analyses of Polycomb targets indicated that in most cases they were detected within 1 kbp of the transcription start site (48). In these HIC1 knocked-down cells, we observed a significantly reduced occupancy of EZH2 all along the ATOH1 promoter and on EFNA1, whereas the occupancy of MYT1 remained constant (Fig. 8F). Strikingly, despite the reduced binding of the H3K27-specific histone methyltransferase EZH2 on ATOH1 and EFNA1, the levels of H3K27me3 modifications were unaffected (Fig. 8F). Furthermore, these genes were not derepressed in HIC1 knock-out cells as measured by qRT-PCR analyses (data not shown). Such a situation is not unprecedented and has been already observed, for example,

in embryonic stem cells knocked-down for Pcl2 (15). Nevertheless, total acetyl-H3 levels were significantly increased on the proximal sites of the ATOH1 promoter (Fig. 8G). This could reflect a partial and incomplete activation of these HIC1 and PRC2 target genes, corresponding to the recently characterized antagonistic switch between H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb target genes (49).

To consolidate these results, we switched to another cell type expressing high levels of endogenous HIC1, the immortalized foreskin fibroblasts BJ-tert. In these cells, a stable HIC1 down-regulation was obtained by retroviral-induced expression of a specific shRNA (Fig. 9A). As expected from our previous results, in the absence of HIC1, we equally observed a significant decrease of EZH2 occupancy all along the ATOH1 locus (Fig. 9C), confirming the implication of HIC1 in PRC2 recruitment. As previously described (12), EZH2 recruitment was not affected in the absence of PHF1 (Fig. 9, B and C, sh PHF1). This could be explained by the constant interaction observed between HIC1 and another PRC2 component EED, independently of PCL proteins (Fig. 5). However, in BJ-tert cells treated with siRNA for a longer period (6 days), H3K27me3 levels on ATOH1 were slightly diminished in the absence of HIC1, although less efficiently than following EZH2 depletion (Fig. 10).

In conclusion, even though H3K27me3 levels remained only slightly affected, HIC1 depletion strongly reduced PRC2 occupancy on ATOH1 in two different cell types and by two independent methods of HIC1 knockdown, namely inactivation by siRNAs or shRNAs. These results thus strongly support a functional interaction between the transcriptional repressor HIC1 and Polycomb-like proteins in WI-38 and BJ-tert fibroblasts and most likely during embryonic development on a subset of HIC1 target genes.

HIC1 and Polycomb Complexes Are Functionally Linked on ATOH1 during Cerebellum Development in Vivo—We finally decided to validate *in vivo* the new relationship established between HIC1 and Polycomb complexes. For this purpose, we focused on mouse cerebellar development as a dynamic functional model of HIC1-induced repression of ATOH1, which is found deregulated in medulloblastomas (47, 50, 51). Briefly, cerebellum is composed of two main cell layers. Postnatal expansion driven by Sonic hedgehog (Shh) of granule cell precursors forms the external granule cell layer composed of proliferative BrdU⁺/ATOH1⁺/HIC1⁻ cells (47, 50, 52). After 7 days of cerebellar development, those cells start to differentiate and migrate through the Purkinje cells and the molecular cell layers to form the mature granule cells, which are BrdU⁻/ATOH1⁻/HIC1⁺ in the internal granule cell layer (47, 50, 52). P5 and P21 mice cerebellum are, respectively, composed in the majority of proliferating granule cell precursor cells and of differentiated mature granule cell cells. Postnatal cerebella were dissected from P5 and P21 mice and ATOH1 repression during development was confirmed by qRT-PCR in P21 cerebellum (Fig. 11A, top panel) in accordance with HIC1 binding on its enhancer as previously described (47) and hereby demonstrated by ChIP (Fig. 11A, bottom panel). Finally, to extend these results in line with our model, epigenetic mark

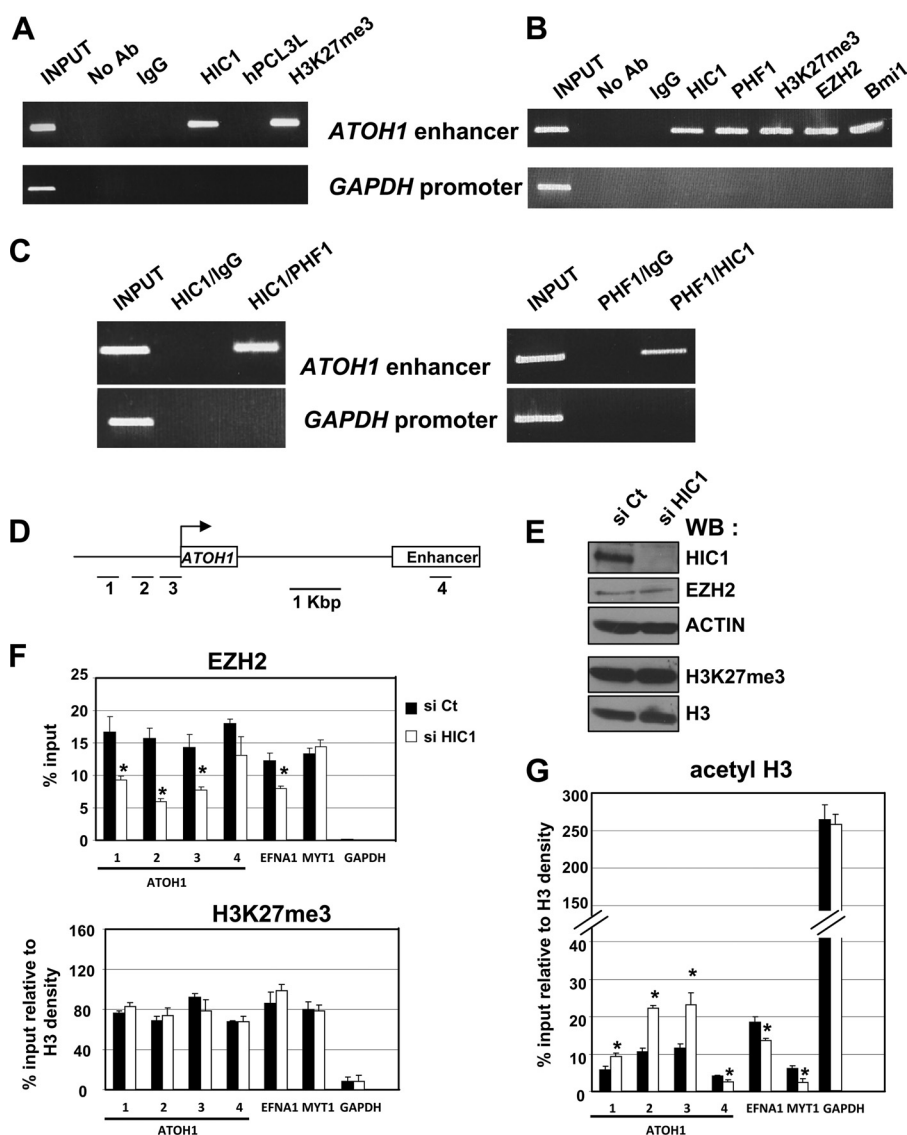


FIGURE 8. EZH2 recruitment on *ATOH1* and *EFNA1* is HIC1-dependent in WI-38 fibroblasts. *A*, *ATOH1* is a target gene common to HIC1 and PRC2 but not to hPCL3. Human WI-38 fibroblasts were analyzed by single ChIP with the indicated antibodies. PCR amplifications were performed with primers flanking the functional HiREs identified in the *ATOH1* enhancer. PCR with the 5' promoter of *GAPDH* was used as an internal nonbinding control. *B*, HIC1 co-localizes with PHF1 and Polycomb complexes at the *ATOH1* enhancer in WI-38 fibroblasts. Human WI-38 fibroblasts were analyzed by single ChIP with the indicated antibodies as described above. *C*, ChIP upon ChIP assays demonstrate that HIC1 and PHF1 might form a stable complex on the *ATOH1* enhancer. Sequential ChIP analyses were performed on WI-38 cells using either anti-HIC1 (left panel) or anti-PHF1 (right panel) antibodies for the first IP. After this first IP, the bound material was eluted, divided in two, and subjected to a second round of immunoprecipitation, respectively, with anti-PHF1 and anti-HIC1 antibodies or non-immune rabbit IgG as control. PCR amplifications were performed as described above. *D*, schematic drawing of the *ATOH1* locus. The unique exon and the enhancer, as described under accession number NM_005712 (gi4885074), are drawn to scale. The positions of the primers used to amplify PCR regions containing potential HIC1 consensus binding sites in the promoter (1 to 3) and in the enhancer (4) are indicated below. *E*, inactivation of endogenous *HIC1* in WI-38 fibroblasts. WI-38 cells were transfected with non-target siRNA control or with *HIC1* siRNA and whole cell extracts were analyzed by Western blotting for the expression levels of HIC1, EZH2, H3K27me3, and total H3. Actin was used as a loading control. *F*, recruitment of EZH2 and levels of H3K27me3 modifications on two HIC1 target genes, *ATOH1* and *EFNA1*, were analyzed by ChIP in WI-38 cells transfected with non-target siRNA control or with *HIC1* siRNA. *MYT1* and *GAPDH* were analyzed similarly, respectively, as a Polycomb target gene and as a control housekeeping gene. Enrichments for EZH2 and H3K27me3 modification were assessed by quantitative real-time PCR in triplicate. *G*, levels of acetyl-H3 were analyzed as described above. Asterisk (*) indicates $p < 0.05$.

occupancy on *ATOH1* were addressed by ChIP-qPCR. As expected from all of our results, in P21 mouse cerebellum, we observed a significant increase of H3K27me3 levels and a concomitant diminution of acetyl-H3 and H3K27me2 levels (Fig. 11, *B* and *C*).

These results confirmed *in vivo* the functional interaction between HIC1 and Polycomb complexes first described *in vitro* through an original mechanism involving Polycomb-like proteins and second, *ex vivo* in WI-38 and BJ-tert cells where HIC1

is necessary for the stable recruitment of the PRC2 complex on a subset of its target genes.

DISCUSSION

In this report, we identified human Polycomb-like proteins, hPCL3 and PHF1, as new HIC1 corepressors. These findings decipher another transcriptional repression mechanism selectively brought about by HIC1 on a subset of its target genes. More generally, we demonstrate for the first time that a

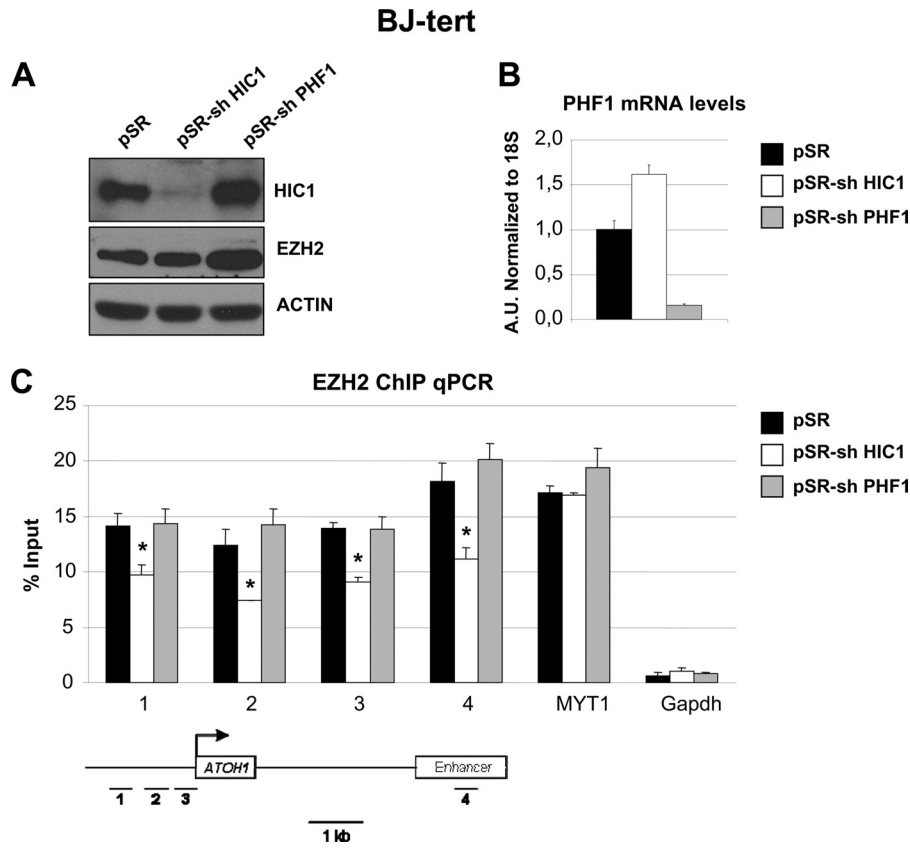


FIGURE 9. **EZH2 recruitment on *ATOH1* is also HIC1-dependent in BJ-tert fibroblasts.** Inactivation of endogenous *HIC1* or *PHF1* in BJ-tert cells were infected with the control pSR vector or with pSR-*HIC1* shRNA or pSR-*PHF1* shRNA. In *A*, whole cell extracts were analyzed by Western blotting for the expression levels of HIC1 and EZH2. Actin was used as a loading control. In *B*, *PHF1* mRNA levels were assessed by quantitative RT-PCR. In *C*, EZH2 enrichment was evaluated by ChIP qPCR on *ATOH1*, *MYT1*, and *GAPDH* as described above. The asterisk (*) indicates $p < 0.05$.

sequence-specific transcription factor interact with Polycomb-like proteins in mammals to favor the recruitment of PCR2 to some of its target genes.

Through yeast two-hybrid screening of a human mammary gland library with the two HIC1 repression domains, BTB-RC, as a bait, we have previously identified the SWI/SNF, CtBP, and NuRD complexes as HIC1 corepressors (27, 32). For these latter two, we have identified two small conserved peptide motifs located in the central region as being involved in the interaction (27, 31, 42). Here, we have validated through various biochemical assays another candidate isolated in the same screen, hPCL3. Interestingly, the interaction between HIC1 and hPCL3 relies mainly on the HIC1 BTB/POZ domain. The BTB/POZ domain is a conserved dimerization and protein/protein interaction domain found in multiple proteins throughout eukaryotic genomes (53, 54). In human, more than 50 proteins contain an N-terminal BTB/POZ domain associated with Krüppel zinc fingers. Most of them are transcriptional repressors that recruit HDAC containing complexes mainly through their BTB/POZ domain, such as for example, BCL6 and PLZF, respectively, implicated in diffuse large B-cell lymphomas and in acute promyelocytic leukemias. By contrast, HIC1 BTB/POZ is a repression domain independent of Class I and Class II HDAC whose repression mechanisms are still elusive (43). Although HIC1 interacts, at least partly through its BTB/POZ domain, with Class III HDAC SIRT1 (20), this interaction could be rather involved in the regulation of HIC1 transcriptional activity

through the acetylation/SUMOylation switch on lysine 314 favoring NuRD recruitment (27, 33). Therefore, our results provide the first mechanistic clue for the repression function of the HIC1 BTB/POZ domain. Notably, the PLZF BTB/POZ domain also interacts with the Polycomb group protein Bmi1, a component of the PRC1 complex (55). Although we cannot totally exclude the participation of the central region, our results demonstrate that the interaction between HIC1 and hPCL3 occurred independently of the CtBP and NuRD complexes. These findings fit perfectly with the model of the hierarchical recruitment of repressing complexes, with HDACs containing complexes first, followed by Polycomb complexes to establish a robust epigenetic silencing of some target genes (55).

Reciprocally, we demonstrate that HIC1 interacts with two domains found in the N-terminal functional module conserved between hPCL3L and PHF1, the TUDOR and PHD2 domains. The TUDOR domain initially characterized in RNA-binding protein is now widely recognized as a domain essential for transcriptional regulation through its binding implicating a cage of 2 to 4 aromatic residues to methylated lysine or arginine in various proteins, including histone tails (56–58). However, a recent NMR study of the *Drosophila* Polycomb-like TUDOR domain revealed that it contained an atypical incomplete “aromatic cage” unlikely to bind methylated lysine or arginine. By contrast, the human PCL orthologs exhibit a complete aromatic cage and might thus bind methylated residues (59). In addition, *Drosophila* and human PCL proteins share a distinct

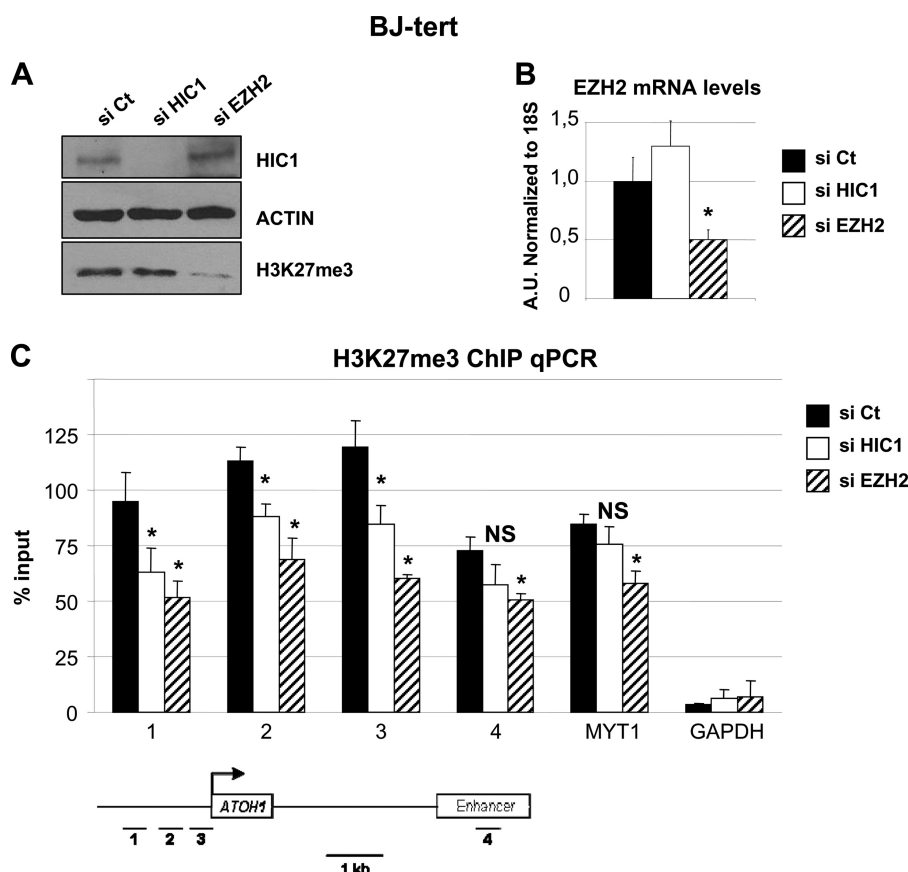


FIGURE 10. **Extended loss of HIC1 affects H3K27me3 levels on ATOH1 in BJ-tert fibroblasts.** Inactivation of endogenous HIC1 or EZH2 in BJ-tert fibroblasts with siRNA treatment for 6 days. In A, whole cell extracts were analyzed by Western blotting for the expression levels of HIC1 and H3K27me3. Actin was used as a loading control. In B, EZH2 mRNA levels were assessed by qRT-PCR. In C, enrichments for H3K27me3 modification were assessed by ChIP qPCR on ATOH1, MYT1, and GAPDH as described above. The asterisk (*) indicates $p < 0.05$.

hydrophobic patch at the surface of their TUDOR domains that could be engaged in protein-protein interactions (59), as shown here for HIC1 and previously for EZH2 (10). Finally, the TUDOR domain is also common to the two hPCL3 isoforms, which exhibit different subcellular localization and belong to different high-molecular weight complexes containing at least EZH2 (10). Therefore, regardless of the final composition and physiological function of these two isoform-specific hPCL3 containing complexes, HIC1 can interact with both of them but the physiological relevance of the interaction between HIC1 and the short isoform of hPCL3 still remains elusive.

Another domain implicated in the interaction with HIC1 is the PHD2 domain. The PHD finger originally characterized as a protein-protein interaction domain is involved in many biochemical functions, notably methyl-lysine binding (60, 61). Its PHD2 domain appears essential for the function of hPCL3 proteins because it is also implicated in the interaction with EZH2 as well as in the self-association of hPCL3L (10). Furthermore, the PHD2 domain of Pcl2 is required for PRC2 targeting in embryonic stem cells (15). Given the high sequence homology in their PHD2 domains, these functional properties might be shared by all human Polycomb-like paralogs. According to the cross-brace model predicted from several structural analyses of PHD fingers (60), this PHD2 domain could be engaged simultaneously in interactions with several partners. It is tempting to speculate that transcription factors could participate in and/or

even stabilize this interaction through concomitant interaction with the PHD2 domains of hPCL proteins.

The mechanisms involved in the targeting of the Polycomb complexes to their target loci display salient differences between *Drosophila* and mammals (62, 63). PcG proteins do not have the ability to bind to DNA except for the recently characterized JARID2 co-factor in embryonic stem cells (4, 5). In *Drosophila*, several transcription factors such as YY1, GAGA factor, or Zeste are required to recruit PcG proteins to *cis*-acting regions called Polycomb repressive elements. Whereas several genomewide mapping studies of PcG binding sites in mammals have been performed (45, 48), no Polycomb repressive elements have been identified in mammals, except in two studies (64, 65). Therefore, several mammalian transcription factors are supposed to recruit PcG proteins to specific loci (1, 62). For example, the PML-RAR α and PLZF-RAR α chimeric fusion proteins implicated in acute promyelocytic leukemia interact, respectively, with PRC2 components EZH2 and SUZ12 (66) and with the PRC1 component Bmi1 (55). Similarly, the Snail1 transcription factor represses *E-cadherin* expression through interaction via SUZ12 and EZH2 (67). Despite these numerous examples, HIC1 is, to the best of our knowledge, the first transcription factor shown to interact with human Polycomb-like proteins.

However, their exact functions still remain elusive. According to studies in *Drosophila* and mammals, they are involved in

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

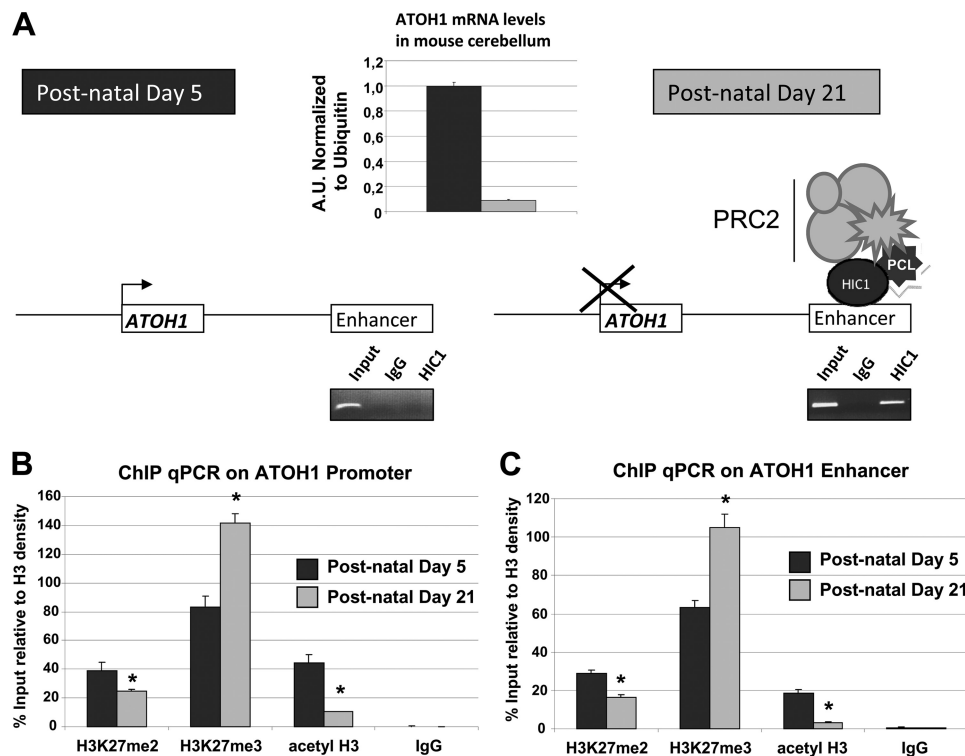


FIGURE 11. HIC1 and Polycomb complexes are functionally linked on ATOH1 during mouse cerebellum development *in vivo*. Postnatal cerebella were dissected from P5 and P21 C57BL/6 mice. In A, ATOH1 mRNA levels were analyzed by quantitative RT-PCR (top panel) and HIC1 binding on ATOH1 enhancer was assessed by ChIP (bottom panel). The middle panel schematically describes the model of Polycomb recruitment by HIC1 on ATOH1 during cerebellar development. In B and C, levels of H3K27 di- and trimethylation and total acetylated H3 were analyzed by ChIP-qPCR on ATOH1 promoter (B) and enhancer (C). The asterisk (*) indicates $p < 0.05$.

recruitment and/or activation of PRC2 (8, 11–15). Our results suggest their implication in the recruitment or stabilization of PRC2 by the transcription factor HIC1.

In our experimental conditions, PRC2 levels were only partly reduced in the absence of HIC1, suggesting that other factors could be involved in their recruitment in addition to HIC1, the latter allowing its stabilization by recruiting Polycomb-like proteins. Following HIC1 decreases, PRC2 could also be maintained at least for a short time on their common target genes, notably by a direct interaction of the EED protein with H3K27me3 (3, 68). Then H3K27me3 could be maintained and this could explain the absence of derepression of target loci as previously reported following knockdown of PCL2 in embryonic stem cells (15). Polycomb target genes are stably repressed and even after the loss of PRC2 components, their re-expression is not obviously observed (48, 69).

HIC1 is a tumor suppressor gene also implicated in normal development (17, 18, 24). Despite its functional importance, very few HIC1 direct target genes have been identified so far. Among them, we have demonstrated the PRC2 recruitment, as assessed by EZH2 co-occupancy and high levels of H3K27 trimethylation, on ATOH1, EFNA1, and CXCR7. ATOH1, a proneuronal transcription factor, essential for migration of granule cell precursors during cerebellum development, has already been identified as a PRC2 target gene in TIG3 human embryonic fibroblasts (45). HIC1 is dynamically regulated through the migration of the granule cell precursors into the internal granule cell layer (47). In addition, loss of HIC1 through hypermethylation of its promoters is often found in medulloblasto-

mas (70). Therefore, the efficient repression of ATOH1 and possibly other targets by HIC1 through PRC2 is intimately linked to cerebellar differentiation and required to avoid tumorigenesis. CXCR7, a scavenger receptor for the chemokine SDF-1 is up-regulated in breast, lung, and prostate tumors, which often display HIC1 hypermethylation (32). Similarly, EFNA1, which encodes a cell surface ligand for Eph tyrosine kinase receptors, is a direct target gene of HIC1 whose deregulation through HIC1 epigenetic silencing contributes to epithelial malignancy (46). CXCR7 (71, 72) and EFNA1 (46, 73) have also been implicated in proper embryonic development.

In conclusion, HIC1 has been implicated in normal development as well as in cellular growth (27, 29, 30, 46) whose deregulation due to HIC1 loss could contribute to tumorigenesis. Thus, the functional interaction of HIC1 with the PRC2 complex in cancer and development remains to be investigated. It will also be essential to decipher the precise mechanisms underlying the differential promoter binding by the various HIC1-corepressors complexes. These studies will help to decipher the roles of HIC1 in development as well as the mechanisms underlying its tumor suppressor function.

Acknowledgments—We thank Dr. Raphaël Margueron for helpful discussions and Dr. Brian R. Rood for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010) Polycomb group proteins. Multifaceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7,

- 299–313
2. Morey, L., and Helin, K. (2010) Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 323–332
 3. Margueron, R., and Reinberg, D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343–349
 4. Pasini, D., Cloos, P. A., Walfridsson, J., Olsson, L., Bukowski, J. P., Johansen, J. V., Bak, M., Tommerup, N., Rappsilber, J., and Helin, K. (2010) JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* **464**, 306–310
 5. Li, G., Margueron, R., Ku, M., Chambon, P., Bernstein, B. E., and Reinberg, D. (2010) Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* **24**, 368–380
 6. Tie, F., Prasad-Sinha, J., Birve, A., Rasmuson-Lestander, A., and Harte, P. J. (2003) A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from *Drosophila* that contains Polycomb-like and RPD3. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3352–3362
 7. Coulson, M., Robert, S., Eyre, H. J., and Saint, R. (1998) The identification and localization of a human gene with sequence similarity to Polycomb-like of *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **48**, 381–383
 8. Walker, E., Chang, W. Y., Hunkapiller, J., Cagney, G., Garcha, K., Torchia, J., Krogan, N. J., Reiter, J. E., and Stanford, W. L. (2010) Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **6**, 153–166
 9. Wang, S., Robertson, G. P., and Zhu, J. (2004) A novel human homologue of *Drosophila* Polycomb-like gene is up-regulated in multiple cancers. *Gene* **343**, 69–78
 10. Boulay, G., Rosnoblet, C., Guérardel, C., Angrand, P. O., and Leprince, D. (2011) Functional characterization of human Polycomb-like 3 isoforms identifies them as components of distinct EZH2 protein complexes. *Biochem. J.* **434**, 333–342
 11. Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., Cohen, A., Stunnenberg, H. G., Wilm, M., and Müller, J. (2007) Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J.* **26**, 4078–4088
 12. Sarma, K., Margueron, R., Ivanov, A., Pirrotta, V., and Reinberg, D. (2008) Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2718–2731
 13. Cao, R., Wang, H., He, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2008) Role of hPHF1 in H3K27 methylation and *Hox* gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1862–1872
 14. Savla, U., Benes, J., Zhang, J., and Jones, R. S. (2008) Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins by Polycomb-like, a component of a novel protein complex in larvae. *Development* **135**, 813–817
 15. Casanova, M., Preissner, T., Cerase, A., Poot, R., Yamada, D., Li, X., Appanah, R., Bezstarosti, K., Demmers, J., Koseki, H., and Brockdorff, N. (2011) Polycomb-like 2 facilitates the recruitment of PRC2 Polycomb group complexes to the inactive X chromosome and to target loci in embryonic stem cells. *Development* **138**, 1471–1482
 16. Wales, M. M., Biel, M. A., el Deiry, W., Nelkin, B. D., Issa, J. P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., and Baylin, S. B. (1995) p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumor suppressor gene on 17p13.3. *Nat. Med.* **1**, 570–577
 17. Fleuriet, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2009) HIC1 (hypermethylated in cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 26–33
 18. Chen, W. Y., Zeng, X., Carter, M. G., Morrell, C. N., Chiu Yen, R. W., Esteller, M., Watkins, D. N., Herman, J. G., Mankowski, J. L., and Baylin, S. B. (2003) Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat. Genet.* **33**, 197–202
 19. Chen, W., Cooper, T. K., Zahnow, C. A., Overholtzer, M., Zhao, Z., Ladanyi, M., Karp, J. E., Gokgoz, N., Wunder, J. S., Andrusis, I. L., Levine, A. J., Mankowski, J. L., and Baylin, S. B. (2004) Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**, 387–398
 20. Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S. B. (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**, 437–448
 21. Jenal, M., Trinh, E., Britschgi, C., Britschgi, A., Roh, V., Vorburger, S. A., Tobler, A., Leprince, D., Fey, M. F., Helin, K., and Tschan, M. P. (2009) The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol. Cancer Res.* **7**, 916–922
 22. Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W. D., and Chen, J. (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1025–1031
 23. Dehennaut, V., and Leprince, D. (2009) Implication of HIC1 (hypermethylated in cancer 1) in the DNA damage response. *Bull. Cancer* **96**, E66–72
 24. Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., and Baylin, S. B. (2000) Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 413–419
 25. Pospichalova, V., Tureckova, J., Faflek, B., Vojtechova, M., Krausova, M., Lukas, J., Sloncova, E., Takacova, S., Divoky, V., Leprince, D., Plachy, J., and Korinek, V. (2011) Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene. *Genesis* **49**, 142–151
 26. Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B. R., Guérardel, C., and Leprince, D. (2004) The tumor suppressor gene *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor. Definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J. Biol. Chem.* **279**, 38313–38324
 27. Van Rechem, C., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., and Leprince, D. (2010) Differential regulation of *HIC1* target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4045–4059
 28. Mohammad, H. P., Zhang, W., Prevas, H. S., Leadem, B. R., Zhang, M., Herman, J. G., Hooker, C. M., Watkins, D. N., Karim, B., Huso, D. L., and Baylin, S. B. (2011) Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in *Apc*(Δ 716) mice. *Oncogene* **30**, 2659–2669
 29. Foveau, B., Boulay, G., Pinte, S., Van Rechem, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2012) The receptor tyrosine kinase *EphA2* is a direct target gene of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1). *J. Biol. Chem.* **287**, 5366–5378
 30. Boulay, G., Malaquin, N., Loison, I., Foveau, B., Van Rechem, C., Rood, B. R., Pourtier, A., and Leprince, D. (2010) Loss of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) in breast cancer cells contributes to stress induced migration and invasion through β -2 adrenergic receptor (ADRB2) misregulation. *J. Biol. Chem.* **287**, 5379–5389
 31. Deltour, S., Pinte, S., Guérardel, C., Wasylyk, B., and Leprince, D. (2002) The human candidate tumor suppressor gene *HIC1* recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4890–4901
 32. Van Rechem, C., Boulay, G., and Leprince, D. (2009) HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**, 586–590
 33. Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007) An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2661–2675
 34. Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997) Mammalian homologues of the Polycomb group gene enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* **16**, 3219–3232
 35. Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Lazzarini Denchi, E., and Helin, K. (2004) Suz12 is essential for mouse development and EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* **23**, 4061–4071
 36. Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* **22**, 5323–5335
 37. Van Rechem, C., Rood, B. R., Touka, M., Pinte, S., Jenal, M., Guérardel, C., Ramsey, K., Monté, D., Bégue, A., Tschan, M. P., Stephan, D. A., and Leprince, D. (2009) Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (*CXCR7*) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J. Biol. Chem.* **284**, 20927–20935
 38. Dahl, J. A., and Collas, P. (2007) Q2 ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of devel-

HIC1 Interacts with Human Polycomb-like Proteins

- opmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* **25**, 1037–1046
39. Srinivasan, L., and Atchison, M. L. (2004) YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev.* **18**, 2596–2601
40. Morey, L., Brenner, C., Fazi, F., Villa, R., Gutierrez, A., Buschbeck, M., Nervi, C., Minucci, S., Fuks, F., and Di Croce, L. (2008) MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5912–5923
41. Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., Behrens, A., Bertone, P., and Hendrich, B. (2011) NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb repressive complex 2 to direct gene repression. *EMBO J.* **31**, 593–605
42. Stankovic-Valentin, N., Verger, A., Deltour-Balerdi, S., Quinlan, K. G., Crossley, M., and Leprince, D. (2006) A L225A substitution in the human tumor suppressor HIC1 abolishes its interaction with the corepressor CtBP. *FEBS J.* **273**, 2879–2890
43. Deltour, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (1999) Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors, The case of HIC-1 and γ FBP-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14831–14836
44. Long, J., Wang, G., Matsuura, I., He, D., and Liu, F. (2004) Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 99–104
45. Bracken, A. P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K. H., and Helin, K. (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **20**, 1123–1136
46. Zhang, W., Zeng, X., Briggs, K. J., Beaty, R., Simons, B., Chiu Yen, R. W., Tyler, M. A., Tsai, H. C., Ye, Y., Gesell, G. S., Herman, J. G., Baylin, S. B., and Watkins, D. N. (2010) A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1. *Oncogene* **29**, 2467–2476
47. Briggs, K. J., Corcoran-Schwartz, I. M., Zhang, W., Harcke, T., Devereux, W. L., Baylin, S. B., Eberhart, C. G., and Watkins, D. N. (2008) Cooperation between the Hic1 and Ptc1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes Dev.* **22**, 770–785
48. Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., and Jaenisch, R. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349–353
49. Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H. R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O. N., and Helin, K. (2010) Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4958–4969
50. Briggs, K. J., Eberhart, C. G., and Watkins, D. N. (2008) Just say no to ATOH. How HIC1 methylation might predispose medulloblastoma to lineage addiction. *Cancer Res.* **68**, 8654–8656
51. Ayrault, O., Zhao, H., Zindy, F., Qu, C., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2010) Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res.* **70**, 5618–5627
52. Grimmer, M. R., and Weiss, W. A. (2008) BMPs oppose Math1 in cerebellar development and in medulloblastoma. *Genes Dev.* **22**, 693–699
53. Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G., and Leprince, D. (1995) The BTB/POZ domain. A new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* **6**, 1193–1198
54. Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., and Privé, G. G. (2005) Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* **6**, R82
55. Boukarabila, H., Saurin, A. J., Batsché, E., Mossadegh, N., van Lohuizen, M., Otte, A. P., Pradel, J., Muchardt, C., Sieweke, M., and Duprez, E. (2009) The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation. *Genes Dev.* **23**, 1195–1206
56. Adams-Cioaba, M. A., and Min, J. (2009) Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 93–105
57. Huang, Y., Fang, J., Bedford, M. T., Zhang, Y., and Xu, R. M. (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double Tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**, 748–751
58. Corsini, L., and Sattler, M. (2007) Tudor hooks up with DNA repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 98–99
59. Friberg, A., Oddone, A., Klymenko, T., Müller, J., and Sattler, M. (2010) Structure of an atypical Tudor domain in the *Drosophila* Polycomb-like protein. *Protein Sci.* **19**, 1906–1916
60. Bienz, M. (2006) The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 35–40
61. Mellor, J. (2006) It takes a PHD to read the histone code. *Cell* **126**, 22–24
62. Bracken, A. P., and Helin, K. (2009) Polycomb group proteins. Navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 773–784
63. Schuettengruber, B., and Cavalli, G. (2009) Recruitment of Polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* **136**, 3531–3542
64. Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Lipshitz, H. D., and Cordes, S. P. (2009) A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* **138**, 885–897
65. Woo, C. J., Kharchenko, P. V., Daheron, L., Park, P. J., and Kingston, R. E. (2010) A region of the human HOXD cluster that confers Polycomb-group responsiveness. *Cell* **140**, 99–110
66. Villa, R., Pasini, D., Gutierrez, A., Morey, L., Occhionorelli, M., Viré, E., Nomdedeu, J. F., Jenuwein, T., Pelicci, P. G., Minucci, S., Fuks, F., Helin, K., and Di Croce, L. (2007) Role of the Polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* **11**, 513–525
67. Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V. M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Di Croce, L., Helin, K., García de Herberos, A., and Peiró, S. (2008) Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4772–4781
68. Hansen, K. H., Bracken, A. P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S. S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., and Helin, K. (2008) A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1291–1300
69. Pasini, D., Bracken, A. P., Hansen, J. B., Capillo, M., and Helin, K. (2007) The Polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 3769–3779
70. Rood, B. R., Zhang, H., Weitman, D. M., and Cogen, P. H. (2002) Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Res.* **62**, 3794–3797
71. Boldajipour, B., Mahabaleshwar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008) Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* **132**, 463–473
72. Sierro, F., Biben, C., Martínez-Muñoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R. P., Martínez-A, C., Mackay, C. R., and Mackay, F. (2007) Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14759–14764
73. Dodelet, V. C., and Pasquale, E. B. (2000) Eph receptors and ephrin ligands. Embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* **19**, 5614–5619

2 Publication n°5

DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair.

J. Biol. Chem. 288, 10254-10264

Vanessa Dehennaut, Ingrid Loison, Marion Dubuissez, Joe Nassour, Corinne Abbadie et Dominique Leprince

Cet article est une partie du travail de Vanessa Dehennaut en Post-Doctorat dans l'équipe quand j'ai débuté ma thèse. Cette étude démontre l'implication de HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN non réparables. L'induction de dommages à l'ADN non réparables promeut la SUMOylation de HIC1 favorisant son interaction avec MTA1 et donc le recrutement du complexe NuRD.

DNA Double-strand Breaks Lead to Activation of Hypermethylated in Cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to Regulate DNA Repair*

Received for publication, September 22, 2012, and in revised form, February 14, 2013. Published, JBC Papers in Press, February 15, 2013, DOI 10.1074/jbc.M112.421610

Vanessa Dehennaut¹, Ingrid Loison, Marion Dubuissez, Joe Nassour, Corinne Abbadie, and Dominique Leprince²

From the CNRS-UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université de Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, IFR 142, 1 rue Calmette, BP447, 59017 Lille Cedex, France

Background: The tumor suppressor gene *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) encodes a transcriptional repressor SUMOylated at Lys-314.

Results: DNA damage favors SUMOylation of HIC1 and its interaction with MTA1 to regulate the DNA repair process.

Conclusion: Our results demonstrate that HIC1 is implicated in the DNA damage response.

Significance: Our work could help explain a mechanism whereby HIC1 loss contributes to tumorigenesis.

HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a tumor suppressor gene frequently epigenetically silenced in human cancers. *HIC1* encodes a transcriptional repressor involved in the regulation of growth control and DNA damage response. We previously demonstrated that HIC1 can be either acetylated or SUMOylated on lysine 314. This deacetylation/SUMOylation switch is governed by an unusual complex made up of SIRT1 and HDAC4 which deacetylates and thereby favors SUMOylation of HIC1 by a mechanism not yet fully deciphered. This switch regulates the interaction of HIC1 with MTA1, a component of the NuRD complex and potentiates the repressor activity of HIC1. Here, we show that HIC1 silencing in human fibroblasts impacts the repair of DNA double-strand breaks whereas ectopic expression of wild-type HIC1, but not of nonsumoylatable mutants, leads to a reduced number of γ H2AX foci induced by etoposide treatment. In this way, we demonstrate that DNA damage leads to (i) an enhanced HDAC4/Ubc9 interaction, (ii) the activation of SIRT1 by SUMOylation (Lys-734), and (iii) the SUMO-dependent recruitment of HDAC4 by SIRT1 which permits the deacetylation/SUMOylation switch of HIC1. Finally, we show that this increase of HIC1 SUMOylation favors the HIC1/MTA1 interaction, thus demonstrating that HIC1 regulates DNA repair in a SUMO-dependent way. Therefore, epigenetic *HIC1* inactivation, which is an early step in tumorigenesis, could contribute to the accumulation of DNA mutations through impaired DNA repair and thus favor tumorigenesis.

Hypermethylated in Cancer 1 (*HIC1*)³ is a tumor suppressor gene located at 17p13.3, a chromosomal region frequently hypermethylated or deleted in numerous cancers (1). HIC1 is widely expressed in healthy tissues whereas *HIC1* is epigenetically silenced in many human cancers (1, 2). The HIC1 protein is a transcriptional repressor that is composed of three main functional domains: a BTB/POZ protein-protein interaction domain (broad complex, tramtrack and bric à brac/pox viruses and zinc finger) in the N-terminal part of the protein (4), a central region, and a C-terminal domain containing five Krüppel-like C₂H₂ zinc fingers which allow the specific binding of the protein to HIC1-responsive elements (HiRE, GGCA consensus) (3). The HIC1 central region contains two short phylogenetically conserved motifs: (i) GLDLSKK, allowing the recruitment of the co-repressor CtBP (C-terminal binding protein) (5, 6) and (ii) MK³¹⁴HEP, whose lysine is competitively acetylated or SUMOylated (7). SUMOylation is a post-translational modification which consists of the covalent attachment of one or several SUMO (small ubiquitin-related modifier) proteins on lysine residues of the target protein. SUMO conjugation is a multistep process (8–10). First, SUMO proteins are synthesized as precursors that must be processed by the SUMO-activating enzyme (E1) to become mature forms. Then, E1 transfers activated SUMO to Ubc9, the SUMO-conjugating enzyme (E2). SUMO is finally transferred from Ubc9 to the substrate with the assistance of one among several SUMO-protein ligases (E3s) that contribute to substrate specificity. Contrary to E1 and E2, which are unique, several E3s have been identified including some members of the PIAS (protein inhibitor of activated STAT) family, the nuclear pore protein RanBP2, the polycomb protein Pc2, and several class II histone deacetylases (HDACs) that enhance SUMOylation independently of their deacetylase activities (8–10). As is the case for

* This work was supported by the CNRS, the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC), and the "Ligue Nationale Contre le Cancer," Comité du Pas de Calais.

¹ Recipient of a postdoctoral fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer. Present address: CNRS-UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille 1, Bâtiment C9, 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-20-87-11-19; Fax: 33-3-20-87-11-11; E-mail: dominique.leprince@ibl.fr.

³ The abbreviations used are: HIC1, hypermethylated in cancer 1; ATM, ataxia telangiectasia mutated; DDR, DNA damage response; DSB, double-strand break; HDAC, histone deacetylase; MEF2, myocyte enhancer factor 2; PIAS, protein inhibitor of activated STAT; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; SUMO, small ubiquitin-related modifier.

MEF2 (myocyte enhancer factor 2) transcription factors (11, 12), we previously showed that the deacetylation/SUMOylation switch of HIC1 is orchestrated by a complex containing two deacetylases belonging to different functional classes: SIRT1 (a class III HDAC) that deacetylates HIC1 and HDAC4 (a class II HDAC) that favors its SUMOylation, probably via an E3 ligase activity (7). We also demonstrated that SUMOylation of HIC1 is essential for its activity because its abolition diminishes its transcriptional repression potential (7) and the recruitment of the NuRD complex on HIC1 target genes (13). Despite its functional importance, the stimuli that induce the SUMOylation of HIC1 are still not known. Here, we hypothesized that it could be induced by DNA damage. Indeed, 11 direct target genes of HIC1 have been described supporting a role for the tumor suppressor in development (14), cell cycle regulation (13), cell migration/invasion (15, 16), and in the DNA damage response (DDR) (17), a process regulated at various levels by SUMOylation (18, 19). The most prominent evidence supporting a role of HIC1 in the DDR came from Chen *et al.* (20), who demonstrated that *Hic1* knock-out murine embryonic fibroblasts (*Hic1*^{-/-}) were more resistant to etoposide treatment than wild-type mouse embryonic fibroblasts. Conversely, these authors found that infection of MCF7 cells with an adenoviral vector expressing HIC1 brings about apoptosis upon etoposide treatment whereas cells infected with a control vector are resistant to the drug, demonstrating that HIC1 is essential to etoposide-induced apoptosis. Moreover, *HIC1* is a direct target gene of p53 (1, 21, 22), and HIC1, in part through the repression of *SIRT1* (which deacetylates and inactivates p53), regulates the p53-dependent apoptotic DDR (20). In the present study, we demonstrate that down-regulation of HIC1 by RNAi in human fibroblasts treated with etoposide impacts DNA repair. Conversely, ectopic expression of wild-type HIC1 but not of non-SUMOylatable mutants leads to a reduced number of γ H2AX foci supporting a role of HIC1 in the regulation of DNA repair in a SUMO-dependent manner. In accordance with this latter observation, we demonstrate that etoposide, bleomycin, or UV-induced DNA double-strand breaks (DSBs) lead to an increase of HIC1 modification by SUMO2 in an ATM (ataxia telangiectasia mutated)-dependent way. This increase of HIC1 SUMOylation is correlated with an increase in its interaction with MTA1. Enhanced SUMOylation of HIC1 requires the prior activation of SIRT1 by SUMOylation on lysine 734 and the subsequent deacetylation of HIC1. Our results also show that DNA DSBs induce the formation of a SIRT1-SUMO1/HDAC4/Ubc9 complex that spawns the deacetylation/SUMOylation switch of HIC1, thus reinforcing the hypothesis that HDAC4 can play the role of SUMO E3 ligase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Chemicals

The full-length FLAG-HIC1 and K314R and E316A point mutants as well as the HA-tagged BTB-CR-G4 and BTB-CR-G4 K314R have been described previously (7). The pTL1-HIC1 expression vector has been described previously (13). The psG5-HDAC4, the His-SUMO1, and His-SUMO2 expression vectors were a kind gift from Jacob S. Seeler (Pasteur Institute,

Paris, France). The expression vector for SENP2 was kindly provided by Ron Hay (University of Dundee, Scotland). The plasmid encoding MTA1 was kindly provided by Rakesh Kumar (M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX). Jean-Luc Baert (Institute of Interdisciplinary Research, Villeneuve d'Ascq, France) kindly provided the expression vector for FLAG-tagged Ubc9. The expression vectors encoding SIRT1 wild-type and K734R point mutant were a kind gift of Wenlong Bai (University of South Florida College of medicine, Tampa, FL).

Etoposide and bleomycin were purchased from Sigma-Aldrich. The ATM kinase inhibitor KU-55933 was purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Cell Culture and Transfection

HEK293T, COS-7, and BJ-tert cells were maintained in Dulbecco modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum and nonessential amino acids and gentamycin. H1299 cells were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with nonessential amino acids, glutamine, 10% fetal calf serum, and gentamycin. Cells were cultured at 37 °C in water-saturated 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected in OptiMEM (Invitrogen) by the PEI (Euro-medex) method as described previously (5) in 100-mm dishes with 2.5 μ g of DNA. Cells were transfected for 6 h and then incubated in fresh complete medium.

Co-immunoprecipitation and Immunoprecipitation Assays

In Transiently Transfected Cells—48 h after transfection, cells were rinsed in cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in cold IPH buffer (50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)) for co-immunoprecipitation or in RIPA buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) for immunoprecipitation. Cell lysates were cleared by centrifugation (14,000 rpm, 4 °C, 15 min). The supernatants were precleared by incubation with 20 μ l of protein A/G-Sepharose beads (Amersham Biosciences) (1 h, 4 °C) and then incubated overnight with 2 μ g of antibody. Then, 20 μ l of protein A/G beads were added for 30 min. The beads were washed four times with IPH buffer for co-immunoprecipitation. For immunoprecipitation four washes were performed, respectively, with RIPA buffer, RIPA/TNE (v/v) (TNE: 10 mM Tris (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM), TNE/NaCl 0.5%, and TNE alone. Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli sample buffer. In the case of immunoprecipitation of SUMOylated HIC1, 10 mM *N*-ethylmaleimide was added to the lysis and washing buffers to prevent de-sumoylation.

In Normal BJ-Tert Fibroblasts—To detect the interaction between endogenous HIC1 and MTA1, nuclear proteins enrichment was first performed as described previously (23). Briefly 2 \times 10⁶ BJ-Tert cells were lysed for 30 min on a rotator at 4 °C in buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT (dithiothreitol), 20 mM NaF, 0.5% Triton X-100 supplemented with 1 \times protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)). After centrifugation (1800 \times g, 4 °C, 10 min), pellets were washed twice with buffer A and resuspended in IPH buffer. Co-immu-

SUMO-HIC1 Controls DNA Repair

noprecipitation assays were then performed as described above.

Western Blotting and Antibodies

To detect SUMOylated form of proteins, cellular extracts were prepared by directly lysing cells in Laemmli sample buffer as described previously (24). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After 1 h of blocking in PBSM (PBS with 5% defatted powdered milk), the membranes were incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies in PBSTM (PBSM with 0.1% Tween) and washed three times with PBSN (PBS with 0.1% Nonidet P-40). The membranes were next incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham Biosciences) in PBSM, washed three times in PBSN, and revealed by chemiluminescence.

The anti-HIC1 2563 and 2247 antibodies have been described previously (5, 23). Rabbit polyclonal anti SUMO2/3 antibody was a kind gift from Jacob S. Seeler (Pasteur Institute, Paris, France). Anti-FLAG antibody (M2) was purchased from Sigma-Aldrich, anti- γ H2AX from Abcam, and anti-acetylsine from Cell Signal. All the others antibodies used in this study were from Santa Cruz Biotechnology.

Small Interfering RNA

BJ-tert fibroblasts were reverse-transfected with RNAiMax according to the manufacturer's instructions using either a 10 nM concentration of a pool of four small interfering RNAs targeting *HIC1* (si HIC1 pool) (HIC1 siGENOME SMART Pool M-006532-01; Dharmacon), four individual *HIC1* siRNAs (si HIC1 #1, #3, #4, and #17) (siGENOME set of 4 upgrade, Human HIC1 (3090) MU-006532-01-0010; Dharmacon), or a scrambled control sequence (si Ctrl) as described previously (15). HEK 293T cells were reverse-transfected with interferin according to manufacturer's instructions using 10 nM small interfering RNA targeting *SIRT1* (SIRT1 siGENOME SMART Pool M-003540-01; Dharmacon), or a scrambled control sequence (si Ctrl). 24 h after siRNA transfection, cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide 24 h later.

Immunofluorescence Staining

Cells cultured on coverslips were washed with PBS, fixed for 20 min in cold 3% (v/v) paraformaldehyde, permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 5 min, saturated for 30 min in 300 μ l of PBS containing 10% (v/v) goat serum, and incubated for 30 min with the anti-HIC1 antibody. The anti- γ H2AX was diluted 1:500 in PBS containing 10% (v/v) goat serum and incubated in the dark for 30 min with FITC and Texas Red-labeled secondary antibodies (GE Healthcare) diluted 1:200 in PBS containing 10% (v/v) goat serum. Between each stage, the cells were washed three times for 5 min in PBS. Nuclei were stained with 10 μ g/ml Hoechst 33342 for 10 min. The cells were then placed inverted on a drop of Immuno-Fluore Mounting Medium (ICN) on a slide. The slides were stored in the dark at 4 °C and visualized under fluorescence using an AxioImager Z1 apotome (Zeiss).

Comet Assay

For each condition, 2000 cells were suspended in 80 μ l of 0.5% low melting point agarose at 42 °C. The suspension was immediately laid onto a comet slide (Trevigen Inc.). Agarose was allowed to solidify at 4 °C for 20 min. The comet slides were then immersed in prechilled lysis solution (1.2 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton (pH 10)) at 4 °C, for 90 min in the dark. After this treatment, comet slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and allowed to equilibrate in electrophoresis buffer for 10 min at 4 °C, in the dark. To detect DSBs, the electrophoresis buffer was 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA (pH 8). The migration was performed at 40 V for 25 min. After migration, the slides were stained with SYBR Green (1000 \times ; Molecular Probes) according to the manufacturer's recommendations. Tail moments (= tail length \times DNA in the tail/total DNA) were analyzed using the Tritex Comet Score freeware.

RESULTS

HIC1 Regulates the DNA Repair Efficiency and/or Kinetics in a SUMO-dependent Manner—DNA DSBs rapidly induce phosphorylation of the histone H2AX (henceforth called γ H2AX) by the ATM kinase at the site of DNA breaks to allow the recruitment of DNA repair proteins (25, 26). To investigate the role of HIC1 in the DDR further, we inactivated *HIC1* by siRNA in BJ-tert fibroblasts (15). For that cells were transfected with either a pool of four siRNAs targeting HIC1 (si HIC1 pool) or with two different individual siRNAs (si HIC1 #1 or #3). As assessed by quantitative RT-PCR analyses (data not shown) and by Western blotting, use of the si HIC1 pool or of the si HIC1 #3 resulted in the complete loss of the protein expression whereas the si HIC1 #1 was not efficient (Fig. 1A). To induce DSBs, cells were first exposed to 20 μ M etoposide for 1 h. In these experimental conditions no cell death was observed at this stage (data not shown) (20). Then cells were washed and reincubated in fresh medium for 4, 6, 8, or 16 h to monitor the DNA repair process (Fig. 1A). We first examined whether *HIC1* knockdown affected the formation of γ H2AX foci using immunofluorescent staining with a phospho-H2AX (Ser-139) antibody (Fig. 1A). One hour after etoposide treatment, we found a similar high rate of γ H2AX foci in both control (si Ctrl and si HIC1 #1) and in HIC1 knocked-down cells (si HIC1 pool and si HIC1 #3), demonstrating that HIC1 did not prevent the formation of γ H2AX foci as previously suggested (20). No differences among the four conditions were seen 4 h after etoposide removal, but salient differences occurred from 6 h. Indeed, approximately 50% of the control cells (si Ctrl) or of the cells transfected with the nonefficient siRNA (si HIC1 #1) still possessed a high rate of γ H2AX foci 6 h after etoposide removal, testifying to an efficient repair of the damaged DNA whereas 69% of the cells transfected with the si HIC1 pool and 77% of the cells transfected with the efficient siRNA (si HIC1 #3) showed many DNA breaks. 16 h after etoposide removal only 22% of the control cells still have a high rate of γ H2AX foci against approximately 40% for the HIC1 knocked-down cells. These results suggest that knockdown of HIC1 impairs the DNA repair process. To test this hypothesis we next evaluated the DNA repair capacity

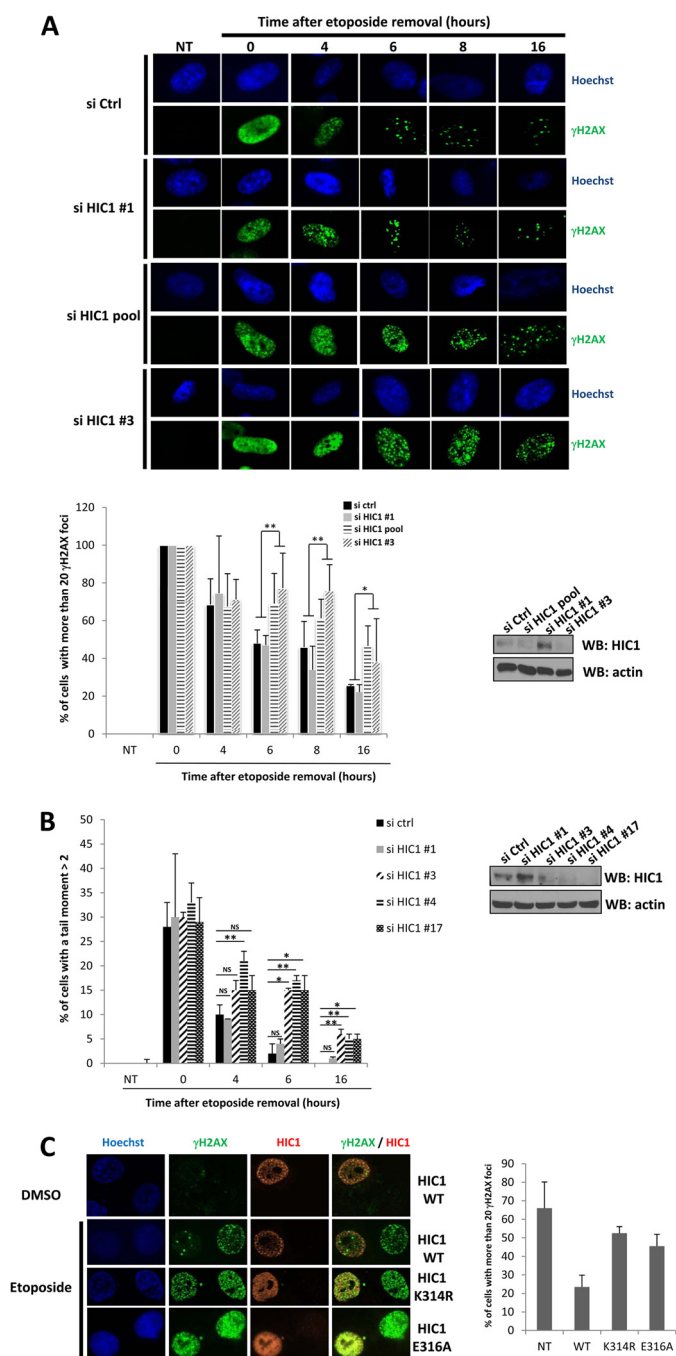


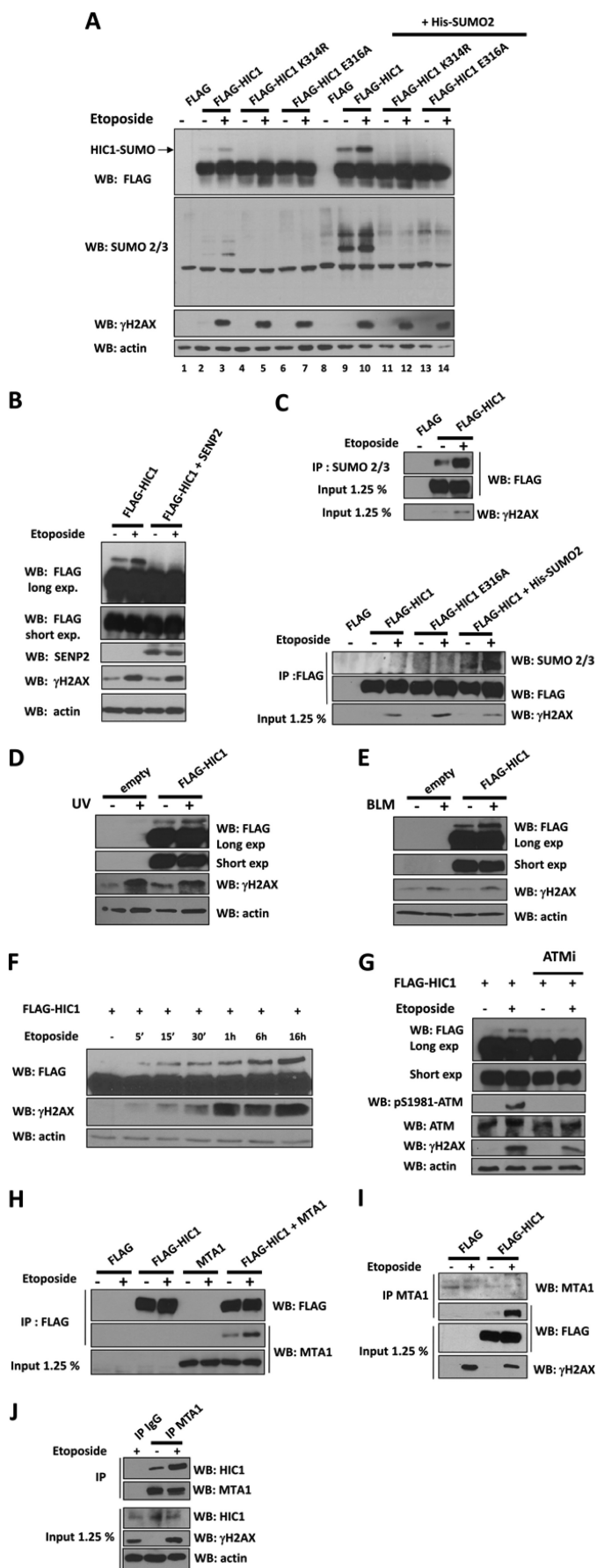
FIGURE 1. HIC1 takes part in the regulation of DNA repair process in a SUMO-dependent way. *A* and *B*, BJ-tert fibroblasts expressing endogenous HIC1 were transfected either with nontarget siRNA control (*si Ctrl*), either with a pool of four siRNAs targeting HIC1 (*si HIC1 pool*) or with four individual HIC1 siRNAs called *si HIC1 #1*, #3, #4, and #17. *A*, 48 h after transfection BJ-tert cells were incubated with 20 μ M etoposide for 1 h, then the drug was removed, and cells were incubated in fresh medium for 4, 6, 8, or 16 h. γ H2AX foci were observed using indirect immunofluorescence. The histogram shows the average percentage \pm S.D. of cells that possess >20 γ H2AX foci (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). RNA interference efficiency was assessed in nontreated cells by Western blotting (WB). NT, nontreated cells. *B*, BJ-tert cells were processed as in *A* before being subjected to the comet assay. The histogram shows the average percentage \pm S.D. of cells with a tail moment > 2 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). *C*, COS-7 cells were transfected with the wild-type HIC1 or the two non SUMOylatable point mutants K314R and E316A. 48 h after transfection cells were incubated with 20 μ M etoposide or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 16 h. Immunofluorescence analyses were performed using γ H2AX and the HIC1 2563 antibody as described under "Experimental Procedures." The histogram shows the percentage of cells with >20 γ H2AX foci 16 h after etoposide depending on whether these cells are nontreated (NT), trans-

ected with the wild-type HIC1 (WT), or transfected with the point mutants K314R and E316A. Results are the mean values \pm S.D. from three independent experiments.

of BJ-tert fibroblasts expressing or not HIC1 by performing the neutral comet assay which specifically measures DSB at the level of individual cells (Fig. 1*B*). For that, BJ-tert fibroblasts were transfected either with *si Ctrl*, *si HIC1 #1* and *si HIC1 #3* as described above. To definitively prove that the observed effects were not owed to off-targets effects, cells were transfected with two other supplemental individual siRNA targeting HIC1: *si HIC1 #4* and *si HIC1 #17* that knock-down the expression of the HIC1 protein with the same efficiency that *si HIC1 #3* (Fig. 1*B*, Western blot). Results showed that the same amounts of DNA fragments were generated from the control and the HIC1 knocked-down cells (Fig. 1*B*, 0h after etoposide removal). However, 6 h after reincubation in etoposide-free medium, we found that cells transfected with the *si HIC1 #3*, #4 and #17 clearly exhibited a significantly higher level of unrepaired DNA than the control cells (*si Ctrl*) and the *si HIC1 #1* transfected cells. Moreover, 16 h after etoposide removal whereas 100% of the control cells have repaired their DNA, DSB are still present for 5% of the three individual *si HIC1* cells. Taken together, these results suggest that HIC1 regulates the efficiency and/or kinetics of DNA repair.

Next, we addressed the importance of HIC1 SUMOylation to this process. To that end, COS-7 cells were transfected with wild-type HIC1 or the K314R mutant (which is neither SUMOylatable nor acetyllatable) or the E316A mutant (which remains acetyllatable but not SUMOylatable) (7) and incubated with etoposide for 16 h (Fig. 1*C*). We observed that ectopic expression of wild-type HIC1 leads to a reduced number of γ H2AX foci compared with the nontransfected cells. In fact, 66% of NT cells possess >20 γ H2AX foci after 16 h in etoposide-containing medium whereas only 23.5% of WT HIC1-expressing cells have a high number of γ H2AX foci. However, approximately half of the cells transfected with the K314R or the E316A mutant still have >20 γ H2AX foci (52.5% for the K314R-transfected cells and 45.5% for the E316A-transfected cells). Taken together, these results demonstrate that HIC1 takes part in the regulation of the DNA repair process in a SUMO-dependent way. This prompted us to investigate whether SUMOylation of HIC1 is induced by etoposide treatment.

DNA DSBs Induce an ATM-dependent Increase of HIC1 SUMOylation and Interaction with MTA1—To test whether DNA damage can induce HIC1 SUMOylation, HEK 293T cells were transfected with the wild-type FLAG-HIC1, the FLAG-HIC1 K314R, or the FLAG-HIC1 E316A point mutant with or without a vector expressing His-tagged SUMO2 (His-SUMO2). 36 h after transfection, cells were treated with 20 μ M etoposide for 16 h. Cells were immediately lysed, and cellular extracts were immunoblotted with anti-FLAG, anti-SUMO2/3, or anti- γ H2AX antibodies to detect the occurrence of DSBs (Fig. 2*A*). No differences in unmodified HIC1 expression and in global SUMOylation level were observed after etoposide treatment. However, we could detect an isoform of higher molecular mass that increases after DNA damage in wild-type HIC1 transfected



cells (compare *lanes 2 and 3*) but that cannot be observed in the K314R and E316A mutants (*lanes 4–7*), supporting the conclusion that this isoform is a SUMOylated form of HIC1. Accordingly, this isoform is more highly expressed when cells overexpress SUMO2 in the basal condition and is clearly increased upon etoposide exposure (Fig. 2A, compare *lanes 2 and 3* with *lanes 9 and 10*). Moreover, it can no longer be detected when cells are co-transfected with the previously described HIC1 desumoylase SENP2 (7) (Fig. 2B). To prove definitively that this was a SUMOylated isoform of HIC1, extracts of HEK 293T cells were transfected with wild-type or E316A FLAG-HIC1, treated or not with etoposide, and subjected to reciprocal co-immunoprecipitation analyses with antibodies against FLAG and SUMO2/3 (in the presence of *N*-ethylmaleimide to prevent deSUMOylation). Anti-SUMO2/3 co-precipitated FLAG-HIC1 in the basal and, in a more significant way, in the etoposide-treated condition (Fig. 2C, *upper panel*). Conversely, anti-FLAG co-precipitated endogenous SUMO2/3 in WT FLAG-HIC1-transfected cells but not in cells expressing the E316A mutant (Fig. 2C, *lower panel*). Such an increase in HIC1 SUMOylation was also demonstrated (i) in H1299 and COS-7 cells after etoposide treatment (data not shown), demonstrating that this phenomenon is not cell type-specific and (ii) in HEK 293T upon UV irradiation and bleomycin treatment (which also leads to DSBs) (Fig. 2, D and E), demonstrating that it is not drug-specific. SUMOylation of HIC1 occurs early in the DDR because we were able to detect it just 5 min after etoposide incubation (Fig. 2F).

Shortly after DSBs occur, the ATM kinase pathway is activated. ATM phosphorylates several key proteins that initiate activation of the DNA damage checkpoint, leading to cell cycle arrest, DNA repair, or apoptosis (27). To test whether SUMOylation of HIC1

FIGURE 2. Etoposide-induced DNA double-strand breaks lead to an increase of HIC1 SUMOylation. A, HEK 293T cells were transfected with the indicated expression vectors. 36 h after transfection, cells were incubated with etoposide for 16 h. Cells were lysed, and extracts were analyzed by Western blotting (WB) using the indicated antibodies. B, cells were transfected with FLAG-HIC1 alone or in conjunction with the desumoylase SENP2 and submitted to etoposide treatment. Cell extracts were analyzed as in A. C, 16 h after treatment with etoposide or dimethyl sulfoxide (as a negative control) cells transfected with the different mentioned vectors were submitted to co-immunoprecipitation with either the anti-SUMO2/3 antibody (*upper panel*) or the anti-FLAG antibody (*lower panel*). The immunoprecipitates (IP) as well as 1.25% of the whole cell lysate (*Input*) were then analyzed by Western blotting. D, HEK 293T cells were transfected either with FLAG-HIC1 or an empty vector. Cells were subjected to UV irradiation (20 Joules/m²; 5 h). Cellular lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. E, HEK 293T cells were transfected either with FLAG-HIC1 or an empty vector. Cells were subjected to bleomycin treatment (BLM, 50 μg/ml, 16 h). Cellular lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. F, HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide for different times before being harvested and analyzed by Western blotting. G, FLAG-HIC1-transfected cells were incubated with or without 5 μM of the ATM inhibitor (ATMi: KU-55933) 1 h prior etoposide treatment. 16 h after etoposide treatment, cell extracts were analyzed by Western blotting. H, HEK 293T cells were co-transfected with FLAG-HIC1 and MTA1 and then incubated or not with etoposide for 16 h. Cells were lysed, and extracts were submitted to co-immunoprecipitation with the anti-FLAG antibody. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (*Input*) were then analyzed by Western blotting with the anti-MTA1 and the anti-FLAG antibodies. I, HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and then incubated with etoposide or not for 16 h. Cells were lysed, and extracts were submitted to co-immunoprecipitation with the anti-MTA1 antibody. J, BJ-tet fibroblasts were incubated with etoposide for 16 h. Co-immunoprecipitation of nuclear proteins was performed as described under “Experimental Procedures.”

requires the activation of the ATM pathway, FLAG-HIC1-transfected cells were preincubated with a specific inhibitor of ATM (KU-55933) prior to etoposide treatment (Fig. 2G). Effectiveness of the ATM inhibitor was confirmed by the absence of the autophosphorylation of ATM on serine 1981. Whereas the basal SUMOylation of HIC1 remained unchanged, the enhanced HIC1 SUMOylation normally observed after DSBs formation did not occur in presence of the ATM inhibitor. Taken together, these results demonstrate that DNA double-strand breaks induce activation of the ATM kinase pathway leading to the specific SUMOylation of HIC1 by SUMO2. We demonstrated previously that SUMOylation favors the repressive capacity of HIC1 (7) in part by potentiating the interaction between HIC1 and MTA1 (13). In accordance with these results, co-immunoprecipitation experiments between HIC1 and MTA1 in transfected HEK 293T cells (Fig. 2, H and I) revealed a stronger interaction between the two proteins after treatment with etoposide. Furthermore, a similar result was obtained in BJ-tert fibroblasts which express endogenous HIC1 and MTA1 proteins (Fig. 2J). Taken together, these results demonstrate that in response to DSBs, SUMOylation of HIC1 increases to favor the recruitment of the NuRD complex by HIC1.

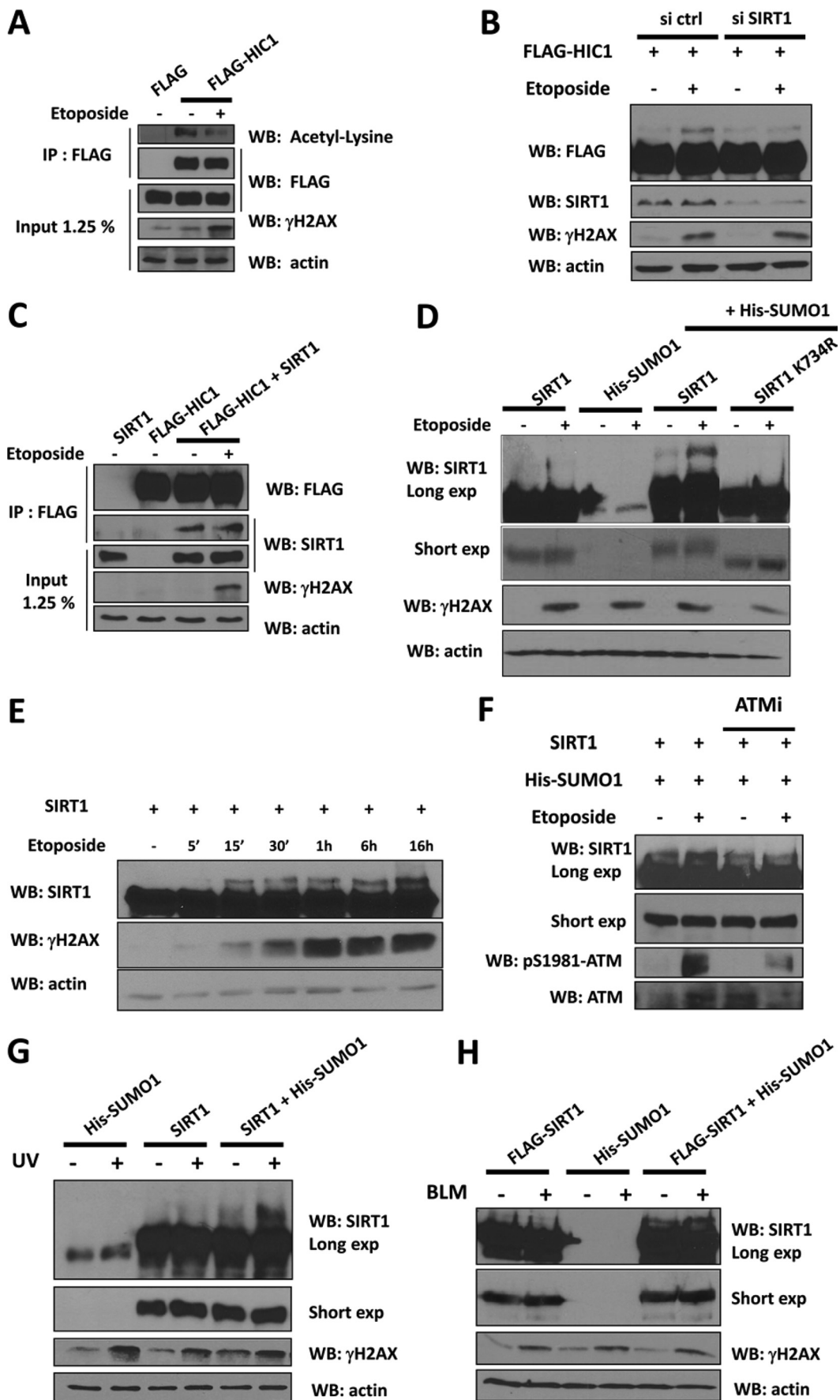
SIRT1 Activation Is Essential for Etoposide-induced HIC1 SUMOylation—HIC1 can be SUMOylated either by members of the PIAS family like PIAS1 and PIASx α (which act on a non-modified HIC1 K314) or as a result of the sequential action of SIRT1 (which acts on an acetylated HIC1 K314) and HDAC4 (7). To determine which mechanism takes place to induce the SUMOylation of HIC1 upon etoposide treatment, HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide for 16 h. Then we performed immunoprecipitation of HIC1 and investigated the level of its acetylated form by Western blotting using an anti-acetyllysine antibody (Fig. 3A). Whereas the total level of HIC1 remained unchanged, acetylated HIC1 was reduced in response to DNA damage, thus inversely mirroring the increase in SUMOylation (Fig. 2) and suggesting the intervention of the SIRT1-HDAC4 complex. In accordance with this result, down-regulation of *SIRT1* expression by RNA interference prevented SUMOylation of HIC1 in response to etoposide (Fig. 3B), demonstrating that the increase of HIC1 K314 SUMOylation required its prior deacetylation by SIRT1. Next, we performed a co-immunoprecipitation experiment including HIC1 and SIRT1 in the presence or absence of etoposide (Fig. 3C). Surprisingly, we did not observe any difference in interaction between the proteins in the two conditions. Therefore, we hypothesized that HIC1 and SIRT1 interact together in a constitutive manner but that SIRT1 activity is specifically activated after DSBs to deacetylate HIC1. Yang *et al.* (28) demonstrated that SIRT1 can be SUMOylated on lysine 734 by SUMO1 and that this SUMOylation increases its deacetylase activity. Therefore, we investigated whether SIRT1 experienced increased SUMOylation in response to DNA damage. To this end, wild-type SIRT1 or the non-SUMOylatable K734R mutant was co-transfected with a vector encoding His-tagged SUMO1. Cells were incubated or not with etoposide, and cell extracts were analyzed by Western blotting using an anti-SIRT1 antibody (Fig. 3D). As with HIC1, we found an

increase of a higher molecular mass isoform of SIRT1 upon etoposide treatment that is not observed for the K734R mutant and that occurred rapidly (Fig. 3E) in an ATM-dependent fashion (Fig. 3F). We also observed an enhanced SUMOylation of SIRT1 after UV irradiation and bleomycin incubation (Fig. 3, G and H). Taken together, these results demonstrate that, in response to DSBs, activation of the ATM pathway leads to SIRT1 activation by SUMOylation on lysine 734 to promote the deacetylation of HIC1 on lysine 314.

Activation of the HIC1 Deacetylation/SUMOylation Switch by DNA Damage Depends on the Formation of a SUMO1-SIRT1/HDAC4/Ubc9 Complex—We previously showed that the HIC1 deacetylation/SUMOylation switch is orchestrated by a complex containing SIRT1 and HDAC4 in which HDAC4 favors the SUMOylation of HIC1 independent of its deacetylase activity, potentially by acting as an E3 SUMO ligase (7). To confirm this latter hypothesis we performed co-immunoprecipitation assays using transfected HIC1 and FLAG-Ubc9 in HEK 293T in the presence or absence of ectopic HDAC4 (Fig. 4A). As shown by immunoblotting with the anti-FLAG antibody, we were able to detect the HIC1/Ubc9 interaction only in the presence of overexpressed HDAC4, demonstrating that HDAC4 indeed plays the role of an E3 ligase; HDAC4 facilitates the association of the E2-conjugating enzyme Ubc9 with its target HIC1. Moreover, and in accordance with the results presented in this study, we demonstrated an enhanced expression of HDAC4 (Fig. 4, B and C) and an increase in its interaction with Ubc9 (Fig. 4B) and SIRT1 (Fig. 4C) upon etoposide treatment. Next, we chose to test the influence of SIRT1-SUMOylation on its interaction with HDAC4 using co-immunoprecipitation experiments. As shown in Fig. 4D, the SIRT1 K734R mutant interacts with HDAC4 to a lesser extent than the wild-type SIRT1, strongly suggesting that the increase of SIRT1 SUMOylation observed after DSBs leads not only to an increase of SIRT1 deacetylase activity (28), but also to an enhancement of the SIRT1/HDAC4 interaction. On the contrary, and in close agreement with the existence of a constitutive interaction between SIRT1 and HIC1 (independent of the activation of SIRT1), we did not observe any difference in interactions between HIC1/SIRT1 wild-type and HIC1/SIRT1 K734R (Fig. 4E). Taken together, our results demonstrate that DSBs favor the formation of a SIRT1-SUMO1/HDAC4/Ubc9 complex that activates the HIC1 deacetylation/SUMOylation switch (Fig. 5).

DISCUSSION

Post-translational modification of proteins with SUMO has been shown to have a plethora of effects, but the concept that SUMOylation is mainly associated with transcriptional repression has slowly emerged (29). Indeed, many transcription activators including Elk1 and Sp3 have been shown to be negatively regulated by SUMO (30, 31). Several transcription co-regulators like BRCA1 (breast cancer 1) (32, 33), KAP1 (Krüppel-associated box (KRAB) domain-associated protein 1) (34, 35) and NEMO (NF- κ B essential modulator) (24, 36) are also SUMOylated. Interestingly, changes in their SUMOylation states occur after genotoxic stress. Interaction of NEMO with the SUMO E3 ligase PIASy has been shown to increase after DNA damage, and SUMO1 modification of NEMO is required



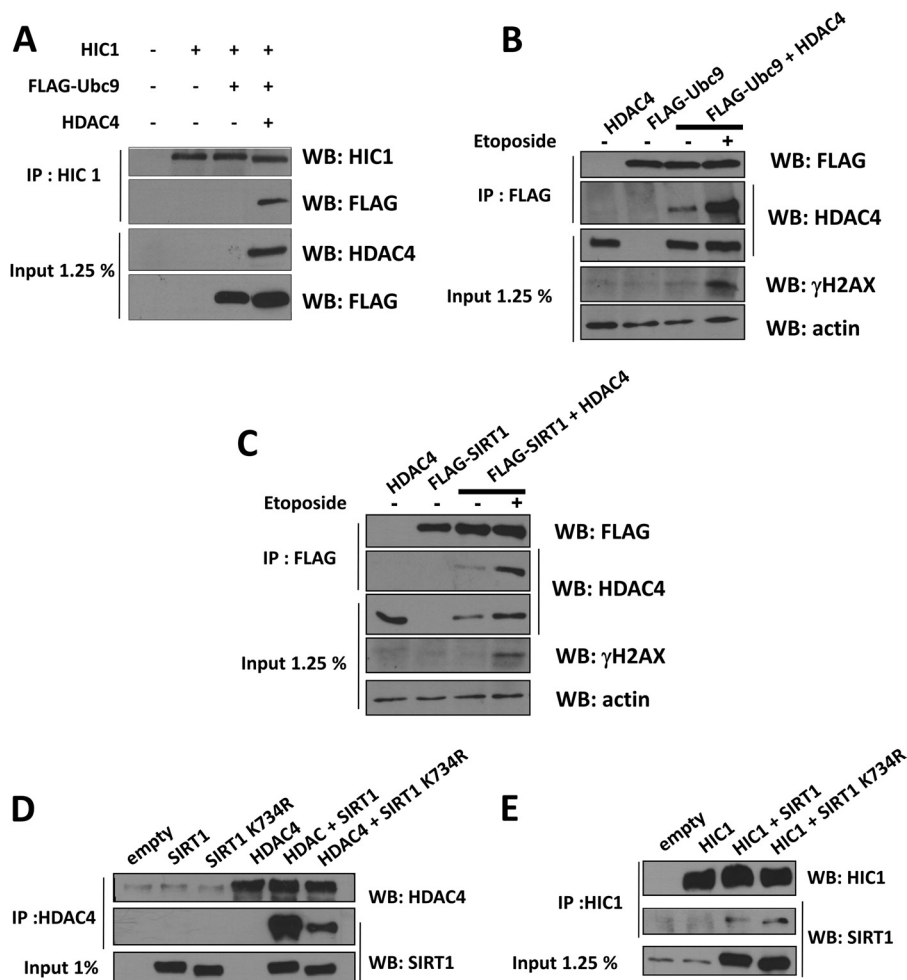


FIGURE 4. A SUMO1-SIRT1/HDAC4/Ubc9 complex drives the etoposide-induced HIC1 deacetylation/SUMOylation switch. *A*, HEK 293T cells were co-transfected with the pTL1-HIC1 vector and FLAG-tagged Ubc9 in the presence or absence of HDAC4. 48 h after transfection, co-immunoprecipitation (IP) of HIC1 was performed using the anti-HIC1 2563 antibody. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (Input) were then analyzed by Western blotting (WB) with the indicated antibodies. *B* and *C*, HEK 293T cells were co-transfected with the indicated vectors, treated with etoposide, and cell lysates were subjected to co-immunoprecipitation using the anti-FLAG antibodies. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (Input) were then analyzed by Western blotting. *D*, HEK 293T cells were co-transfected with HDAC4 and either the wild-type SIRT1 or the K734R SIRT1 point mutant. 48 h after transfection cells were lysed, and extracts were submitted to co-immunoprecipitation with the anti-HDAC4 antibody. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (Input) were then analyzed by Western blotting with the anti-HDAC4 and the anti-SIRT1 antibodies. *E*, HEK 293T cells were co-transfected with pTL1-HIC1 and either the wild-type SIRT1 or the K734R SIRT1 point mutant. 48 h after transfection cells were lysed, and extracts were submitted to co-immunoprecipitation with the anti-HIC1 2563 antibody. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (input) were then analyzed by Western blotting with the anti-HIC1 and the anti-SIRT1 antibodies.

for activation of NF- κ B in response to etoposide and camptothecin (24, 36). Park *et al.* (32) demonstrated that SUMO1 represses BRCA1-induced transcription of *Gadd45 α* , *p21*, and *p27* genes in response to DNA damage, and co-localization of BRCA1, SUMO1, and several PIAS E3 ligases with γ H2AX foci has been brought to the fore (33). Finally, SUMOylation of the

co-repressor KAP1 is required for its interaction with the methyl histone transferase SETDB1 (SET domain bifurcated 1) and with the NuRD complex (37); doxorubicin was shown to decrease KAP1 SUMOylation via its ATM-mediated phosphorylation on serine 824 (34, 35). In accordance with the role of SUMOylation in transcriptional repression and DNA damage response, we have

FIGURE 3. Etoposide induces activation of SIRT1 by SUMOylation leading to subsequent deacetylation of HIC1. *A*, 16 h after treatment with etoposide or dimethyl sulfoxide (as a negative control) FLAG-HIC1 or empty vector (FLAG)-transfected cells were submitted to immunoprecipitation (IP) with the anti-FLAG antibody. Acetylation level of HIC1 was assessed by Western blotting (WB) using an anti-acetyllysine antibody. *B*, HEK 293T cells were transfected either with nontarget control siRNA (*si ctrl*) or with SIRT1 siRNA (*si SIRT1*) before being transfected with FLAG-HIC1. Cells were then incubated or not with etoposide for 16 h and analyzed by Western blotting. *C*, HEK 293T cells were co-transfected with FLAG-HIC1 and SIRT1 and then incubated or not with etoposide for 16 h. Cells were lysed, and extracts were submitted to co-immunoprecipitation with the anti-FLAG antibody. The immunoprecipitates as well as 1.25% of the whole cell lysate (Input) were then analyzed by Western blotting. *D*, HEK 293T cells were transfected with the indicated expression vectors. 36 h after transfection, cells were incubated with etoposide for 16 h. Cells were lysed, and extracts were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. *E*, HEK 293T cells were transfected with SIRT1 and treated with etoposide for different times before being harvested and analyzed by Western blotting. *F*, SIRT1- and SUMO1-co-transfected cells were incubated with or without 5 μ M ATM inhibitor (*ATMi*: KU-55933) 1 h prior etoposide treatment. 16 h after etoposide treatment, cell extracts were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. *G*, HEK 293T cells were transfected with the indicated vectors. Cells were subjected to UV irradiation (20 Joules/m²; 5 h). Cellular lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. *H*, HEK 293T cells were transfected with the indicated vectors. Cells were subjected to bleomycin treatment (*BLM*, 50 μ g/ml, 16 h). Cellular lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.

SUMO-HIC1 Controls DNA Repair

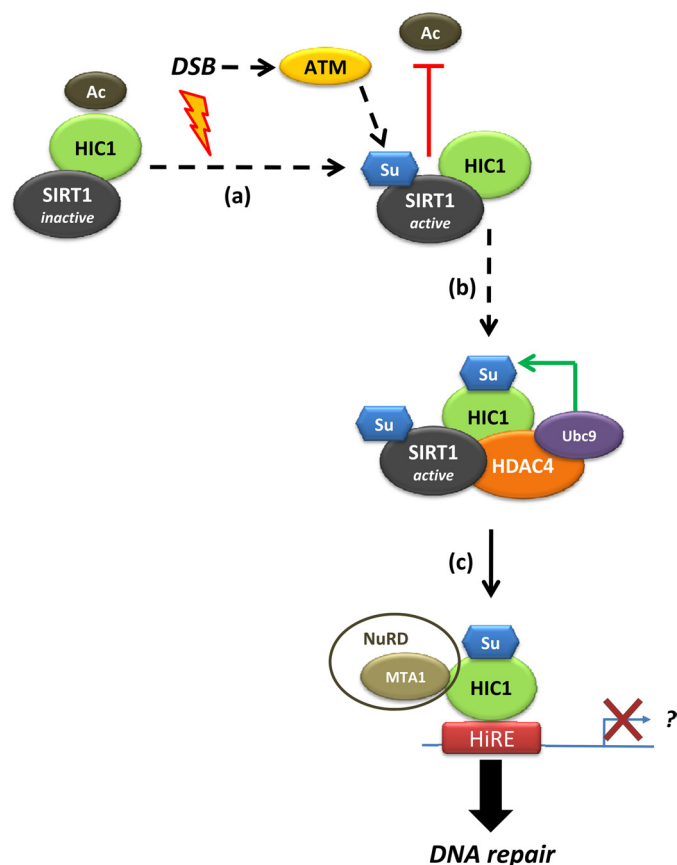


FIGURE 5. Sketch depicting the main findings of this study. Our work demonstrates that DNA DSB formation induced by etoposide, bleomycin, or UV irradiation leads to the deacetylation of HIC1 followed by an increase in its SUMOylation at lysine 314 in an ATM-dependent manner. This deacetylation/SUMOylation switch is allowed by the activation of SIRT1 by SUMOylation (a) that in turn, on the one hand, deacetylates HIC1 and, on the other hand, recruits HDAC4 and Ubc9 close to HIC1 to allow its subsequent SUMOylation (b). c, in its SUMOylated form HIC1 recruits more efficiently the NuRD complex via enhanced interaction with MTA1 to repress the transcription of some target genes which remain to be identified to favor the DNA repair process.

demonstrated that the transcriptional repressor HIC1 is activated by SUMOylation after DNA double-strand breakage to regulate the DNA repair process. This enhanced SUMOylation requires its prior deacetylation by SIRT1 which constitutively interacts with HIC1 but which is also activated by SUMOylation following DNA damage (Fig. 5). SUMOylation of SIRT1 at lysine 734 was first demonstrated by Yang *et al.* (28). In this study the authors demonstrated a decrease in SIRT1 SUMOylation after genotoxic stress induced either by H₂O₂ or UV radiation. They also observed that H1299 or HCT116 cells that ectopically expressed wild-type SIRT1 were less sensitive to UV-induced apoptosis whereas cells overexpressing the K734R mutant incurred a higher rate of apoptosis than parental cells. These authors therefore proposed that SUMOylation of SIRT1 at lysine 734 could represent a molecular switch that tips the balance from survival to cell death in response to DNA damage. We also observed a decrease of SIRT1 SUMOylation after H₂O₂ incubation that was correlated with a de-SUMOylation of HIC1 (data not shown). However, in our hands, modification of SIRT1 with SUMO-1 increases after UV irradiation in HEK 293T (Fig. 3G). This discrepancy is probably due to the dose of UV used, the differing time of exposure in the two studies, and differences in the sen-

sitivity of cells toward UV irradiation because in our experimental conditions we did not observe significant cell death. Consistent with these observations, one could hypothesize that SUMOylation of SIRT1 acts as a sensor of DNA damage intensity. In the case of repairable damage SUMOylation of SIRT1 increases to allow the deacetylation/SUMOylation switch of HIC1 and DNA repair. On the other hand, if the damage is too extensive, SENP1 desumoylates and inactivates SIRT1 to ensure the acetylation and activation of the proapoptotic substrates p53 and p73. Moreover, HIC1 can bind to the *SIRT1* promoter to repress its transcription (13, 20) whereas *SIRT1* (38) and *HIC1* (1, 21, 22) are both p53 direct target genes, suggesting the existence of a complex equilibrium among the three proteins during the different steps of the DDR. Interestingly, we found that the increased SUMOylation of HIC1 and SIRT1 observed after etoposide treatment both require an activated ATM kinase pathway. So investigation of the putative phosphorylation of HIC1 and/or SIRT1 by ATM or by the ATM-activated kinase Chk2 will be helpful to further decipher the molecular mechanisms leading to HIC1 activity upon DSBs. Preliminary results obtained from mass spectrometry analyses identified several HIC1 phosphorylation sites, most notably serine 294, which is included in a conserved Ser/Pro consensus site.⁴ However, a nonphosphorylatable mutant of this serine (HIC1 S294A) remains SUMOylatable, and an increase of SUMOylation still occurs after treatment of HIC1 S294A mutant bearing cells with etoposide (data not shown).

HDACs are best known as transcriptional co-repressors through deacetylation of histone tails (39), but increasing evidence suggests that some of them can also act as SUMO E3 ligases. This is the case for HDAC2, which favors SUMOylation of eIF4E (40), HDAC7 which promotes modification of PML (promyelocytic leukemia protein) with SUMO1 (41), and HDAC4 which potentiates the SUMOylation of the androgen receptor (42), of MEF2 (11, 12), and of HIC1 (7). In the present study, we showed that HDAC4 is able to interact with Ubc9 as previously reported by Zhao *et al.* (11), but our work demonstrated for the first time that this interaction is stimulated by DNA damage. As with HIC1, SUMOylation of MEF2 requires its prior deacetylation by SIRT1, but until now the mechanism by which the two deacetylases acted had not been deciphered. Here, we show that SUMOylation of SIRT1 favors its interaction with HDAC4 and that a SIRT1-SUMO-1/HDAC4/Ubc9 complex is loaded on HIC1 to drive the deacetylation/SUMOylation switch (Fig. 5).

Our previous work has also demonstrated that SUMOylation of HIC1 potentiates its repressor function (7) in part by favoring its interaction with MTA1, one of the components of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complexes (13). In accordance with these results, we observed an increased interaction between HIC1 and MTA1 upon etoposide treatment of transfected cells or of normal human fibroblasts endogenously expressing HIC1 and MTA1 (Fig. 2, F–H). Several studies have highlighted the importance of MTA1 in the regulation of the DNA damage response. More particularly, depletion of

⁴ V. Dehennaut, I. Loison, A. Page, T. Lefebvre, and D. Leprince, unpublished results.

MTA1 in mouse embryonic fibroblasts (MTA1^{-/-}) (43, 44) or silencing of MTA1 by RNAi in U2OS (45) each renders cells hypersensitive to ionizing radiation, demonstrating that MTA1 interferes with the DNA repair process. Interestingly, the mechanisms by which MTA1 regulates DNA repair have been shown to be both p53-dependent, by regulating p53 stability (therefore independent of its role as a co-repressor) (43, 46) and p53-independent by repressing the transcription of the cdk inhibitor p21^{waf1} (44).

To summarize, our results demonstrate that HIC1 regulates the DNA repair process in a SUMO-dependent way. Our results suggest a model whereby HIC1 recruits MTA1 to the promoters of SUMO-sensitive target genes that remain to be identified but whose repression is important for proper DNA repair. Identifying these target genes specifically repressed by HIC1/MTA1 upon etoposide treatment by a ChIP-seq approach will be the next step to a better understanding of the exact contribution of HIC1 to the DNA repair process and how epigenetic inactivation of *HIC1* could favor tumorigenesis.

Acknowledgments—We thank Drs. Jean-Luc Baert, Wenlong Bai, Ron Hay, Rakesh Kumar, and Jacob S. Seeler for the expression vectors used in this study; and Drs. Brian Rood and Sebastien Pinte and Prof. Tony Lefebvre for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Wales, M. M., Biel, M. A., el Deiry, W., Nelkin, B. D., Issa, J. P., Cavenee, W. K., Kuerbitz, S. J., and Baylin, S. B. (1995) p53 activates expression of *HIC-1*, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat. Med.* **1**, 570–577
- Fleurbaey, C., Touka, M., Boulay, G., Guérardel, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2009) *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 26–33
- Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Rood, B. R., Guérardel, C., and Leprince, D. (2004) The tumor suppressor gene *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J. Biol. Chem.* **279**, 38313–38324
- Deltour, S., Guérardel, C., and Leprince, D. (1999) Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and γ FBP-B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 14831–14836
- Deltour, S., Pinte, S., Guérardel, C., Wasyluk, B., and Leprince, D. (2002) The human candidate tumor suppressor gene *HIC1* recruits CtBP through a degenerate GLDLSSK motif. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4890–4901
- Stankovic-Valentin, N., Verger, A., Deltour-Balerdi, S., Quinlan, K. G., Crossley, M., and Leprince, D. (2006) A L225A substitution in the human tumour suppressor HIC1 abolishes its interaction with the corepressor CtBP. *FEBS J.* **273**, 2879–2890
- Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007) An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2661–2675
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956
- Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18**, 1–12
- Gareau, J. R., and Lima, C. D. (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 861–871
- Zhao, X., Sternsdorf, T., Bolger, T. A., Evans, R. M., and Yao, T. P. (2005) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 8456–8464
- Grégoire, S., and Yang, X. J. (2005) Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2273–2287
- Van Rechem, C., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., and Leprince, D. (2010) Differential regulation of *HIC1* target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 4045–4059
- Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., and Baylin, S. B. (2000) Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 413–419
- Boulay, G., Malaquin, N., Loison, I., Foveau, B., Van Rechem, C., Rood, B. R., Poutier, A., and Leprince, D. (2012) Loss of hypermethylated in cancer 1 (*HIC1*) in breast cancer cells contributes to stress-induced migration and invasion through β_2 -adrenergic receptor (ADRB2) misregulation. *J. Biol. Chem.* **287**, 5379–5389
- Foveau, B., Boulay, G., Pinte, S., Van Rechem, C., Rood, B. R., and Leprince, D. (2012) The receptor tyrosine kinase *EphA2* is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (*HIC1*). *J. Biol. Chem.* **287**, 5366–5378
- Dehennaut, V., and Leprince, D. (2009) Implication of *HIC1* (hypermethylated in cancer 1) in the DNA damage response. *Bull. Cancer* **96**, E66–72
- Dou, H., Huang, C., Van Nguyen, T., Lu, L. S., and Yeh, E. T. (2011) SUMOylation and de-SUMOylation in response to DNA damage. *FEBS Lett.* **585**, 2891–2896
- Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2011) The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett.* **585**, 2914–2919
- Chen, W. Y., Wang, D. H., Yen, R. C., Luo, J., Gu, W., and Baylin, S. B. (2005) Tumor suppressor *HIC1* directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**, 437–448
- Guérardel, C., Deltour, S., Pinte, S., Monte, D., Begue, A., Godwin, A. K., and Leprince, D. (2001) Identification in the human candidate tumor suppressor gene *HIC-1* of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J. Biol. Chem.* **276**, 3078–3089
- Britschgi, C., Rizzi, M., Grob, T. J., Tschan, M. P., Hügli, B., Reddy, V. A., Andres, A. C., Torbett, B. E., Tobler, A., and Fey, M. F. (2006) Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* **25**, 2030–2039
- Boulay, G., Dubuissez, M., Van Rechem, C., Forget, A., Helin, K., Ayrault, O., and Leprince, D. (2012) Hypermethylated in cancer 1 (*HIC1*) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *J. Biol. Chem.* **287**, 10509–10524
- Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., and Miyamoto, S. (2003) Sequential modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- κ B activation by genotoxic stress. *Cell* **115**, 565–576
- Shiloh, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response taking shape. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 402–410
- Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010) Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* **9**, 1219–1228
- Riches, L. C., Lynch, A. M., and Gooderham, N. J. (2008) Early events in the mammalian response to DNA double-strand breaks. *Mutagenesis* **23**, 331–339
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olshaw, N., Zhang, X., Nicosia, S. V., Bhalla, K., and Bai, W. (2007) SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1253–1262
- Gill, G. (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 536–541
- Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol. Cell* **12**, 63–74
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell* **10**, 831–842
- Park, M. A., Seok, Y. J., Jeong, G., and Lee, J. S. (2008) SUMO1 negatively

- regulates BRCA1-mediated transcription, via modulation of promoter occupancy. *Nucleic Acids Res.* **36**, 263–283
33. Morris, J. R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Butler, L., Galanty, Y., Pangon, L., Kiuchi, T., Ng, T., and Solomon, E. (2009) The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature* **462**, 886–890
 34. Lee, Y. K., Thomas, S. N., Yang, A. J., and Ann, D. K. (2007) Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 1595–1606
 35. Li, X., Lee, Y. K., Jeng, J. C., Yen, Y., Schultz, D. C., Shih, H. M., and Ann, D. K. (2007) Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **282**, 36177–36189
 36. Mabb, A. M., Wuerzberger-Davis, S. M., and Miyamoto, S. (2006) PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* **8**, 986–993
 37. Ivanov, A. V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K. L., Negorev, D. G., Schultz, D. C., Psulkowski, E., Fredericks, W. J., White, D. E., Maul, G. G., Sadofsky, M. J., Zhou, M. M., and Rauscher, F. J., 3rd (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol. Cell* **28**, 823–837
 38. Nemoto, S., Fergusson, M. M., and Finkel, T. (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**, 2105–2108
 39. Martin, M., Kettmann, R., and Dequiedt, F. (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* **26**, 5450–5467
 40. Xu, X., Vatsyayan, J., Gao, C., Bakkenist, C. J., and Hu, J. (2010) HDAC2 promotes eIF4E sumoylation and activates mRNA translation gene specifically. *J. Biol. Chem.* **285**, 18139–18143
 41. Gao, C., Ho, C. C., Reineke, E., Lam, M., Cheng, X., Stanya, K. J., Liu, Y., Chakraborty, S., Shih, H. M., and Kao, H. Y. (2008) Histone deacetylase 7 promotes PML sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Mol. Cell Biol.* **28**, 5658–5667
 42. Yang, Y., Tse, A. K., Li, P., Ma, Q., Xiang, S., Nicosia, S. V., Seto, E., Zhang, X., and Bai, W. (2011) Inhibition of androgen receptor activity by histone deacetylase 4 through receptor SUMOylation. *Oncogene* **30**, 2207–2218
 43. Lee, F. Y., Faivre, E. J., Suzawa, M., Lontok, E., Ebert, D., Cai, F., Belsham, D. D., and Ingraham, H. A. (2011) Eliminating SF-1 (NR5A1) sumoylation *in vivo* results in ectopic hedgehog signaling and disruption of endocrine development. *Dev. Cell* **21**, 315–327
 44. Li, D. Q., Pakala, S. B., Reddy, S. D., Ohshiro, K., Peng, S. H., Lian, Y., Fu, S. W., and Kumar, R. (2010) Revelation of p53-independent function of MTA1 in DNA damage response via modulation of the p21 WAF1-proliferating cell nuclear antigen pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 10044–10052
 45. Chou, D. M., Adamson, B., Dephoure, N. E., Tan, X., Nottke, A. C., Hurov, K. E., Gygi, S. P., Colaiacovo, M. P., and Elledge, S. J. (2010) A chromatin localization screen reveals poly(ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 18475–18480
 46. Li, D. Q., Divijendra Natha Reddy, S., Pakala, S. B., Wu, X., Zhang, Y., Rayala, S. K., and Kumar, R. (2009) MTA1 coregulator regulates p53 stability and function. *J. Biol. Chem.* **284**, 34545–34552

3 Publication n°6

HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF-kappaB Signaling and Promotes Tissue Damage-associated Tumorigenesis

Mol. Cancer Res. MCR. (2015)

Lucie Janeckova, Vendula Pospichalova, Bohumil Fafilek, Martina Vojtechova, Jolana Tureckova, Jan Dobes, Marion Dubuissez, Dominique Leprince, Nikol Baloghova, Monika Horazna, Adela Hlavata, Jitka Stancikova, Eva Sloncova, Katerina Galuskova, Hynek Strnad and Vladimir Korinek

Cette étude est le travail d'une collaboration effectuée avec l'équipe du Dr Korinek en République Tchèque afin de mettre en évidence un nouveau gène cible direct de HIC1, *TLR2*. Ce gène code un récepteur impliqué dans la détection d'agents pathogènes afin d'initier la réponse immunitaire au niveau de l'intestin. J'ai participé à cette étude en réalisant les expériences dans les fibroblastes BJ-hTert.

HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF- κ B Signaling and Promotes Tissue Damage-Associated Tumorigenesis

Lucie Janeckova¹, Vendula Pospichalova¹, Bohumil Fafilek¹, Martina Vojtechova¹, Jolana Tureckova¹, Jan Dobes¹, Marion Dubuissez², Dominique Leprince², Nikol Baloghova¹, Monika Horazna¹, Adela Hlavata¹, Jitka Stancikova¹, Eva Sloncova¹, Katerina Galuskova¹, Hynek Strnad¹, and Vladimir Korinek¹

Abstract

Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) represents a prototypic tumor suppressor gene frequently inactivated by DNA methylation in many types of solid tumors. The gene encodes a sequence-specific transcriptional repressor controlling expression of several genes involved in cell cycle or stress control. In this study, a *Hic1* allele was conditionally deleted, using a Cre/loxP system, to identify genes influenced by the loss of Hic1. One of the transcripts upregulated upon Hic1 ablation is the *toll-like receptor 2 (TLR2)*. *Tlr2* expression levels increased in Hic1-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEF) and cultured intestinal organoids or in human cells upon *HIC1* knockdown. In addition, HIC1 associated with the *TLR2* gene regulatory elements, as detected by chromatin immunoprecipitation, indicating that *Tlr2* indeed represents a direct Hic1 target. The Tlr2 receptor senses "danger" signals of microbial or endogenous origin to

trigger multiple signaling pathways, including NF- κ B signaling. Interestingly, Hic1 deficiency promoted NF- κ B pathway activity not only in cells stimulated with Tlr2 ligand, but also in cells treated with NF- κ B activators that stimulate different surface receptors. In the intestine, Hic1 is mainly expressed in differentiated epithelial cells and its ablation leads to increased Tlr2 production. Finally, in a chemical-induced mouse model of carcinogenesis, Hic1 absence resulted in larger Tlr2-positive colonic tumors that showed increased proportion of proliferating cells.

Implications: The tumor-suppressive function of Hic1 in colon is related to its inhibitory action on proproliferative signaling mediated by the Tlr2 receptor present on tumor cells. *Mol Cancer Res*; 13(7); 1139–48. ©2015 AACR.

Introduction

The *HIC1* gene was isolated as a candidate tumor suppressor gene during tumor DNA hypermethylation screen of the chromosome 17 short arm, a chromosomal region which is frequently reduced to homozygosity in human cancers (1). *Hic1*^{-/-} mice die prenatally due to severe developmental defects of craniofacial structures and limbs (2). *Hic1*^{+/-} mice are viable; however, they develop spontaneous malignant tumors that are Hic1 deficient due to the intact *Hic1* allele methylation (3). Hic1 protein functions as an evolutionarily conserved transcription repressor, which cooperates with several partners to regulate expression of

multiple target genes (4). The protein is composed of three structural domains. The Broad complex, Tramtrack, Bric à brac/POx viruses, and Zinc finger (BTB/POZ) domain responsible for Hic1 multimerization is situated N-terminally, followed by the central region binding co-repressors such as C-terminal binding protein (CtBP). The C-terminal domain consists of five zinc fingers providing affinity to the specific Hic1-responsive (HiRE) sequence motif in DNA (5). The known Hic1 target genes participate in diverse cellular processes, including cell-cycle regulation, cell differentiation, DNA damage response, and metastatic invasion (reviewed in ref. 4). *Hic1* transcription is positively regulated by p53 protein, a key molecule inducing either cell-cycle arrest or apoptosis upon various cellular stress-inducing insults (6). Conversely, the p53 activity is restrained by a protein deacetylase encoded by the *sirtuin 1 (Sirt1)* gene, whose expression is blocked by Hic1. *Hic1* inactivation thus leads to functional suppression of p53, allowing damaged cells to escape the p53-mediated response (7). Besides the direct regulation of gene expression, Hic1 attenuates transcription via interaction with other transcription factors. For example, association with Wnt pathway effector T-cell factor 4 (TCF4) sequesters TCF4 (and its transcriptional activator β -catenin) to nuclear speckles called Hic1 bodies. Subsequently, expression of the TCF4/ β -catenin-responsive genes is inhibited (8).

The tissue maintenance of the single-layer intestinal epithelium is sustained by intestinal stem cells (ISC) that reside at the bottom

¹Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. ²CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Lille Cedex, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Research Online (<http://mcr.aacrjournals.org/>).

Current address for V. Pospichalova: Faculty of Science, Masaryk University, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic.

Corresponding Author: Vladimir Korinek, Institute of Molecular Genetics AS CR, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Phone: 420-241063146; Fax: 420-244472282; E-mail: korinek@img.cas.cz

doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0033

©2015 American Association for Cancer Research.

of invaginations called intestinal crypts, where ISCs divide regularly and give rise to transit amplifying cells (TA). Rapidly dividing TA cells migrate upward and while exiting the crypt, they differentiate to absorptive enterocytes, mucus-producing goblet cells, and hormone-secreting enteroendocrine cells. In the small intestine, differentiated cells cover finger-like protrusions called villi; the surface of the colon is flat. The intestinal epithelium self-renewing in 3 to 5 days represents one of the most rapidly self-renewing tissues in the mammalian body. One exception from the outlined scheme are Paneth cells that secrete bactericidal cryptidins, defensins, or lysozyme. These relatively long-lived cells are present in the small intestine only. Moreover, during maturation, the Paneth cell does not migrate from the crypt but stays at the crypt bottom, where it persists for 6 to 8 weeks (reviewed in ref. 9). Owing to the dynamic turnover, the intestinal epithelium is at high risk of carcinogenesis. Although aberrant activation of the Wnt pathway initiates the majority of colorectal carcinomas (reviewed in ref. 10), CRC development is a multistep process that entails accumulation not only of genetic, but also of epigenetic changes in epithelial cells (11). The physiologic role of HIC1 in the intestine has not yet been elucidated in detail. However, in the mouse, Hic1 represses *atonal homolog 1* (*Atoh1*) and *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*) genes, which are involved in the cell fate determination of secretory cell lineages in the small intestine (12–14).

In the present study, we used a conditional knock-out of the *Hic1* gene (15) to identify genes repressed by Hic1. Expression profiling of mouse embryonic fibroblasts (MEF) revealed six novel Hic1 target genes, including *Tlr2*. Tlr2 functions as a microbial sensor to initiate inflammation and immune responses. In addition, the receptor recognizes endogenous inflammatory mediators released from dead cells (review in ref. 16). Upon ligand binding, Tlr2 triggers several signal transduction pathways, including NF- κ B signaling that activates expression of proinflammatory cytokines and enzymes, such as tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin 6 (IL6), and cyclooxygenase-2 (Cox2) (17). Solid tumors contain inflammatory infiltrates, and many recent studies have shown association between inflammation and increased risk of cancer development and progression. Furthermore, there is growing evidence that Tlr2 activators released from cancer cells might initiate persistent inflammation found in many tumors (reviewed in ref. 18). However, two recent studies documented an inflammation-independent Tlr2 role in promoting gastric and intestinal cancer (17, 19). Here, we show that *Hic1* depletion in the intestinal epithelium resulted in increased Tlr2 expression that promoted proliferation of colonic tumors induced by chemical carcinogenesis.

Materials and Methods

Experimental mice

Housing of mice and *in vivo* experiments were performed in compliance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and national and institutional guidelines. Animal care and experimental procedures were approved by the Animal Care Committee of the Institute of Molecular Genetics (Ref. 82/2011). Generation and genotyping of *Hic1^{fllox/fllox}* and Hic1 citrine reporter (*Hic1^{cit/+}*) mice was described previously (15). The *Rosa26-CreERT2* [B6.129-Gt (ROSA)26Sor^{tm1(cre/ERT2)Tyj}/J] mouse strain was purchased from The Jackson Laboratory and was genotyped as recommended by the provider. *Villin-CreERT2* and *Villin-Cre* transgenic mice (20)

were kindly provided by Sylvie Robine (Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France). Animals were housed in specific pathogen-free conditions. Tumors of the colon and rectum were collected from adult *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺* mice 5 weeks after a single subcutaneous injection of azoxymethane [(AOM); 10 mg/kg; purchased from Sigma] that was followed by a 5-day dextran sodium sulfate (DSS) treatment in drinking water [2% (w/v) DSS; MW 36–50 kDa; MP Biomedicals]. The mice were euthanized and the intestines were dissected, washed in PBS, and fixed in 4% formaldehyde (v/v) in PBS for 3 days. Fixed intestines were embedded in paraffin, sectioned and stained. The number and size of the neoplastic lesions were quantified using Ellipse software (ViDiTo). Colitis was induced by DSS (2% in the drinking water for 5 days) without AOM treatment. Colons were collected 2, 6, and 9 days upon DSS withdrawal.

Cell and organoid culture, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) treatment

MEFs were isolated from embryos obtained at embryonic day (E) 11 to E14, details of the procedure are given in Supplement. For Cre-mediated recombination, cells were cultured in the presence of 4-OHT at a final concentration of 2 μ mol/L (prepared from 1 mmol/L solution in ethanol; Sigma). Control cells were treated with the corresponding amount of ethanol. Small intestinal crypts were isolated and cultured according to the previously published protocol (21). Colonic crypts were isolated using the same procedure, but the culture medium was additionally supplemented with conditioned medium obtained from mouse Wnt3a-producing L cells (L-Wnt3a; ref. 22). L-Wnt3a, HEK293, and BJ-Tert cells were purchased from the ATCC (Cat. No.: CRL-2647, CRL-1573, and CRL-4001, respectively). All cell lines were obtained in 2006 and maintained in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FBS (Gibco), penicillin, streptomycin, and gentamicin (Invitrogen). Upon receipt, cells were expanded and aliquots of cells at passage number <10 were stored frozen in liquid nitrogen. Cells from one aliquot were kept in culture for less than 2 months after resuscitation. The cell identity was not authenticated by the authors.

Microarray analysis

Total RNA was isolated from MEFs harvested 24, 48, 72, and 120 hours upon 4-OHT addition using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). Control cells were grown with the same volume of vehicle (ethanol). The quality of isolated mRNA was checked using Agilent Bioanalyzer 2100; RNAs with RNA integrity number (RIN) above 8 were further processed. Two biologic replicates were used for each time point and treatment. The RNA samples were analyzed using MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina). Raw data were processed using the beadarray package of Bioconductor and analyzed as described previously (23). Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using the Enricher gene analysis tool (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>; ref. 24). Microarray data were deposited in ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) under accession number E-MTAB-3486.

Luciferase reporter assay, biochemistry, RNAi

MEFs were electroporated (details are given in Supplement); transfection of HEK293 cells was performed using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Luciferase reporter constructs NF- κ B-Luc and pRL-TK were purchased from Promega. To generate Tlr2-Luc reporter plasmid, genomic DNA containing the mouse Tlr2 promoter region encompassing nucleotides –796 to +52 (the

transcription start site corresponds to position +1) was amplified by PCR and cloned into the pGL4.26 luciferase reporter vector (Promega). The HIC1 construct was described previously (8). Details of the luciferase assay and NF- κ B pathway stimulation are given in Supplement. For RNAi, BJ-Tert fibroblasts were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 10 nmol/L small interfering RNA (siRNA) targeting *HIC1* (HIC1 siGENOME SMART Pool M-006532-01, Dharmacon) or a scrambled control siRNA (siCtrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon) and harvested 2 days upon transfection.

ChIP and droplet digital PCR

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) using chromatin obtained from immortalized BJ-Tert fibroblasts was performed as described previously (25). Occupancy of gene regulatory regions by HIC1 was assayed by ddPCR (QX200, Bio-Rad) using EvaGreen master mix (Bio-Rad). PCR primers are listed in Supplement.

FACS

Paneth cell sorting was performed according to the previously published protocol (26). Antibodies used for flow cytometry: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD24 (12-0242-81, eBioscience), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-EpCam (17-5791-80, eBioscience), FITC-conjugated anti-CD45 (ED7018, ExBio).

IHC

The technique was performed as described previously (27, 28). Hematoxylin and eosin (Sigma) were used for counterstaining. Antibodies are given in Supplement. For visualization of citrine fluorescence, intestines dissected from *Hic1^{cit/+}* and wild-type (wt) mice were snap frozen in liquid nitrogen and immediately sectioned. Specimens were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI; Life Technologies) and the citrine fluorescence signal was evaluated using a laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP5).

Western blotting and antibodies

Hic1-specific polyclonal antisera were generated in rabbit or chicken immunized with the recombinant His-tagged fragment of human HIC1 protein (amino acids 154-396). Commercially available antibodies are given in Supplement.

RNA purification and reverse-transcription quantitative PCR

Total RNAs were isolated from cells and tissues using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and reversely transcribed and analyzed by qRT-PCR as described previously (29). The primers are listed in Supplementary Table S1.

Statistical analysis of data

Results of the gene reporter assay, Ellipse, and qRT-PCR analysis were evaluated by the Student *t* test. Datasets obtained using DNA microarrays were analyzed in the R environment using the package LIMMA (Linear Models for Microarray Data LIMMA; ref. 30).

Results

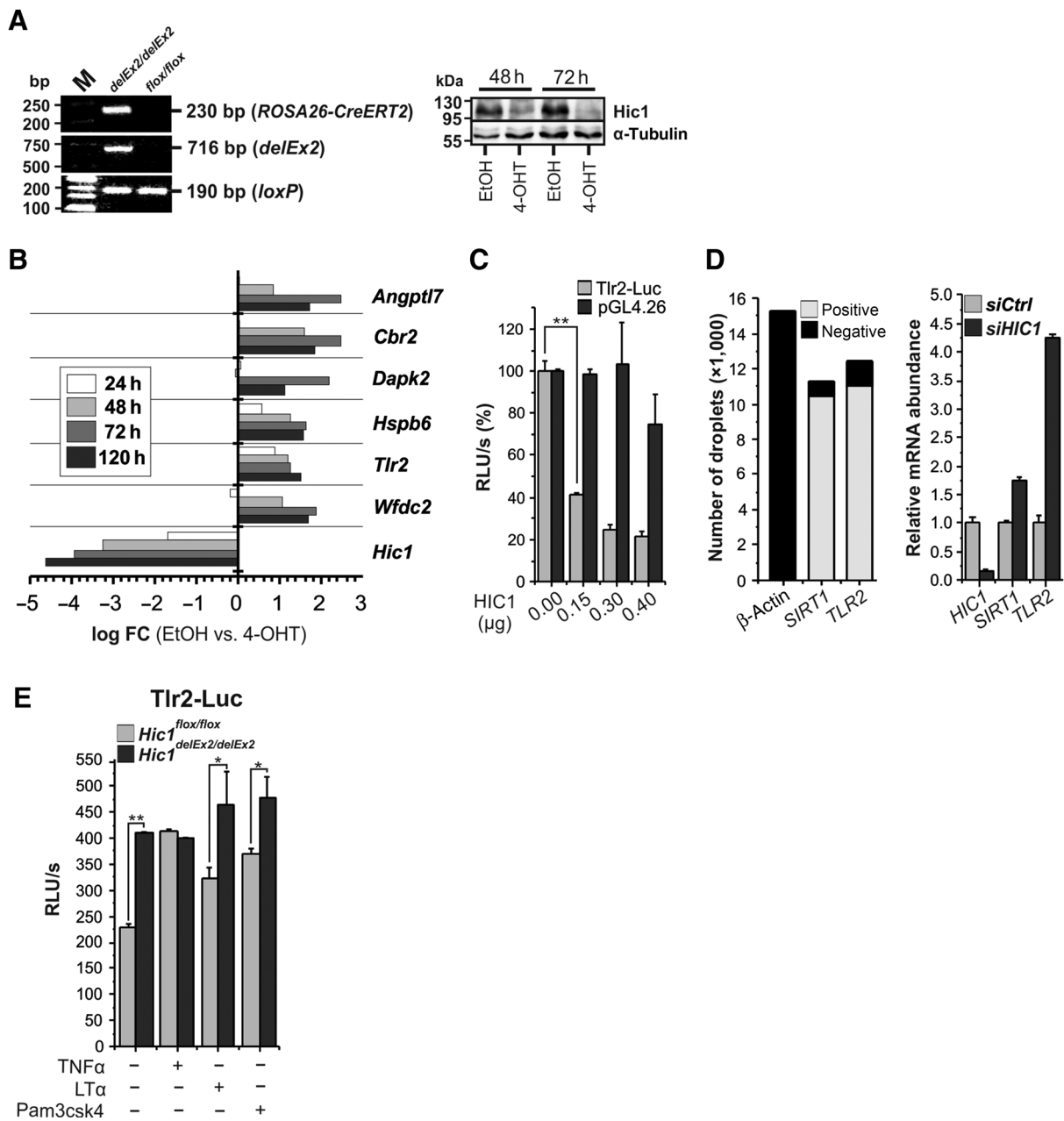
Identification of *Tlr2* as a novel target gene repressed by Hic1 in mouse and human cells

To investigate the biologic function of transcription repressor Hic1, we have recently developed the *Hic1^{fllox/fllox}* mouse strain that

enables conditional inactivation of the *Hic1* gene (15). These mice were crossed to *Rosa26-CreERT2* animals expressing Cre recombinase estrogen receptor T2 fusion protein (CreERT2) from the *Rosa26* locus (31). The fusion protein resides in the cytoplasm until an antagonist of the estrogen receptor, tamoxifen (or its active metabolite 4-OHT), is administered. Subsequently, Cre enzyme is translocated into the nucleus, where it allows excision of DNA sequences flanked, that is, "floxed", by loxP sites (32). MEFs were isolated from embryos, cultured with 4-OHT or vehicle (ethanol) and genotyped by PCR to confirm locus recombination and generation of the *Hic1^{delEx2}* allele. Simultaneously, the presence of Hic1 protein was detected by immunoblotting (Fig. 1A). Subsequently, total RNA was isolated at four time points after the addition of 4-OHT (or vehicle) into the culture media, and microarray analysis of the expression profile was performed. The analysis revealed genes whose expression was changed significantly ($q < 0.05$) after the *Hic1* locus recombination. Furthermore, six genes were upregulated in at least two time points and more than twice [the binary logarithm of fold change ($\log FC$) > 1 ; Fig. 1B and Supplementary Fig. S1 and Supplementary Table S2]. These genes were *angiopoietin-like 7 (Angptl7)*, *carbonyl reductase 2 (Cbr2)*, *death-associated protein kinase 2 (Dapk2)*, *HSP, α -crystallin-related, B6 (Hspb6)*, *Tlr2*, and *WAP four-disulfide core domain 2 (Wfdc2)*. In addition, increased expression of previously identified HIC1 target genes *cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (CDKN1A; ref. 33)*, *Sox9* (13), and *Sirt1* (7) was observed, but these genes did not satisfy the significance criteria (not shown). Rather unexpectedly, the GSEA analysis using the Enricher gene library online tool (24) revealed that the inactivation of the *Hic1* gene in MEFs mainly altered expression of genes involved in lipid metabolism (Supplementary Table S3).

As recent evidence supports the role of TLR signaling in inflammation-associated tumorigenesis in the gastrointestinal tract (reviewed in ref. 34), we further investigated the relationship between Hic1 and *Tlr2* expression. First, we generated a *Tlr2*-Luc reporter by subcloning genomic DNA harboring the *Tlr2* promoter region before the luciferase sequence. Then, we cotransfected the *Tlr2*-Luc reporter together with the expression construct encoding HIC1 into HEK293 cells and performed the luciferase reporter assay. As expected, increasing amounts of HIC1 resulted in reduced activity of the reporter, whereas cotransfection with a control "empty" plasmid had no significant effect (Fig. 1C). Moreover, we used a HIC1-specific antibody to perform ChIP using chromatin isolated from BJ fibroblasts that express detectable amounts of endogenous HIC1 (25). Droplet digital PCR confirmed the enrichment of genomic DNA encompassing the promoter regions of *TLR2* and *SIRT1* (used as positive control) genes in the precipitate. Importantly, none of these regions was precipitated using a control "irrelevant" antibody and, furthermore, the anti-HIC1 antibody did not pull down the β -ACTIN promoter used as negative control. In addition, upregulation of *TLR2* and *SIRT1* was detected upon *HIC1* mRNA knockdown (Fig. 1D and data not shown). The *Tlr2* gene is activated by NF- κ B signaling (35); therefore, the luciferase assay was performed in MEFs stimulated with NF- κ B pathway activators TNF α , LT α , and with synthetic bacterial lipopeptide Pam3csk4, which functions as the *Tlr2* ligand (36). Interestingly, Pam3csk4 appeared to be the most potent enhancer of the *Tlr2*-Luc activity, especially upon Hic1 deletion; however, the *Tlr2*-Luc activity was also significantly increased upon stimulation with unrelated LT α . In addition, the luciferase reporter assay clearly showed increased *Tlr2*-Luc activity

Janeckova et al.

**Figure 1.**

Tlr2 represents a novel direct target gene of transcriptional repressor Hic1. A, left, PCR genotyping of MEFs isolated from *Hic1^{flox/flox} Rosa26^{CreERT2/+}* embryos. Cells were cultured with 4-OHT for 4 days. PCR on the homozygous *flox/flox* and hemizygous *CreERT2* allele produced 190 bp or 230 bp DNA fragments, respectively. Cre-mediated recombination generated the *delEx2* allele lacking the second *Hic1* exon encoding the major part of the protein. The recombination is documented by the presence of the 716-bp PCR product. Right, immunoblotting of *Hic1^{flox/flox} Rosa26^{CreERT2/+}* cell lysates obtained from MEFs 48 and 72 hours after adding 4-OHT or solvent [ethanol (EtOH)]. Western blotting with an anti- α -tubulin antibody was used as a loading control. B, expression profile of *Hic1^{delEx2/delEx2}* MEFs compared to *Hic1^{flox/flox}* cells at the indicated time points after adding 4-OHT. The decrease in *Hic1* mRNA levels was accompanied by significant upregulation ($q < 0.05$) of six genes; log FC, binary logarithm of fluorescent intensity of the indicated gene-specific probe upon hybridization with labeled RNA isolated from MEFs treated with 4-OHT versus fluorescent intensity obtained using RNA isolated from cells treated with vehicle only. C, luciferase reporter assays in HEK293 cells cotransfected with the *Tlr2*-Luc reporter or control vector pGL4, respectively, together with increasing amounts of HIC1-producing plasmid. D, left, ddPCR using genomic DNA obtained from human BJ cells by ChIP with an anti-HIC1 antibody. Although PCR using primers designed from the promoter regions of *SIRT1* and *TLR2* genes, that is, genes directly repressed by HIC1, produced mainly droplets containing a PCR product, PCR with primers designed from the β -ACTIN promoter gave droplets without any product. Right, qRT-PCR analysis of BJ cells upon HIC1 knockdown. Expression level of the respective gene in cells treated with non-silencing siRNA (siCtrl) was set to 1. E, luciferase reporter assays in MEFs electroporated with *Tlr2*-Luc reporter plasmid. Cells were stimulated overnight with TNF α , LT α , or Pam3csk4. The histograms represent average luciferase light units per second (RLU/s) obtained in three independent experiments performed in triplicates. The values were corrected for efficiency of electroporation using *Renilla* luciferase as the internal control. Error bars represent SDs; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

in Hic1-deficient MEFs when compared with cells with the intact *Hic1* locus (Fig. 1E). Several studies indicate the NF- κ B pathway activation via Tlr2 signaling (37, 38). Thus, we next examined the consequence of *Hic1* deficiency for the NF- κ B pathway. Luciferase reporter assay using the NF- κ B-Luc reporter showed increased NF- κ B signaling even in unstimulated *Hic1*^{delEx2/delEx2} cells (compared with MEFs before Cre-mediated *Hic1* inactivation). Treatment of cells with Pam3csk4 further potentiated the reporter activity. However, increased NF- κ B signaling was also observed upon stimulation with LT α and TNF α , indicating that the NF- κ B pathway output was not completely dependent on Tlr2 (over) expression (Fig. 2A). The augmentation of the NF- κ B pathway activity in Hic1-deficient MEFs was confirmed by qRT-PCR analysis that showed increased expression of the putative NF- κ B target genes *Cox2* and *TNF α* (Fig. 2B). In agreement with these results, immunoblotting revealed increased levels of the phosphorylated transcriptionally active form of the nuclear mediator of NF- κ B signaling p65 (Fig. 2C). In summary, all the data supported direct transcriptional repression of *Thr2* by Hic1 and, moreover, potentiation of the NF- κ B pathway activity upon loss of the *Hic1* gene.

Hic1 depletion in the intestinal epithelium results in *Tlr2* upregulation

In the intestinal epithelium, the *Hic1* expression was examined using previously generated Hic1-citrine "reporter" mice. In this mouse strain, the sequence encoding the central and C-terminal portions of Hic1 protein was replaced by cDNA encoding citrine (yellow) fluorescent protein (15). In both the small and large intestine, native citrine fluorescence was observed in epithelial cells (Fig. 3A). Subsequently, production of Hic1 protein in the gut epithelia was confirmed by immunoblotting using cell lysates prepared from crypts and differentiated cells lining the villi in the

small intestine or intercrypt regions (ICR) in the colon. The analysis revealed higher amounts of Hic1 in the villus and ICR fractions when compared with the crypts. This result was confirmed by qRT-PCR using total RNA isolated from the same epithelial fractions (Fig. 3B). In order to evaluate the expressional changes of the putative Hic1 target genes in epithelial cells, we established three-dimensional "organoid" cultures (21) from the small intestinal crypts of *Hic1*^{fllox/fllox} Villin-CreERT2⁺ mice producing tamoxifen-regulated Cre enzyme in all intestinal cell lineages (20). Interestingly, Cre-mediated inactivation of the *Hic1* gene increased mRNA levels of all genes identified by the microarray analysis. Furthermore, like in MEFs, Hic1 deficiency resulted in upregulation of the NF- κ B-responsive genes *Cox2* and *TNF α* (Fig. 3C). In addition, Tlr2 was analyzed in *Hic1*^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺ mice expressing the constitutively active form of Cre enzyme in the embryonic and adult gut epithelia (20). Although efficient recombination and generation of the *Hic1*^{delEx2} allele along the rostro-caudal axis of the gastrointestinal tract was confirmed by PCR genotyping (data not shown), these mice—lacking *Hic1* in the intestinal epithelium—were viable, showing no signs of any health problems. However, IHC staining showed increased Tlr2 positivity in the small intestine and colon (Fig. 3D).

Hic1-deficient intestinal epithelium contains increased numbers of secretory cell lineages

As morphology and proliferation of the *Hic1*^{loxP/loxP} Villin-Cre⁺ intestinal epithelium appeared to be normal, we performed detailed analysis of all major cellular lineages present in the small intestine. Maturation of Paneth cells is driven by transcription factors *Atoh1* and *Sox9* (14). Interestingly, Hic1 is a transcriptional repressor of *Atoh1* and *SOX9* in the mouse developing cerebellum and in U2OS osteosarcoma cells, respectively (12, 13). Using

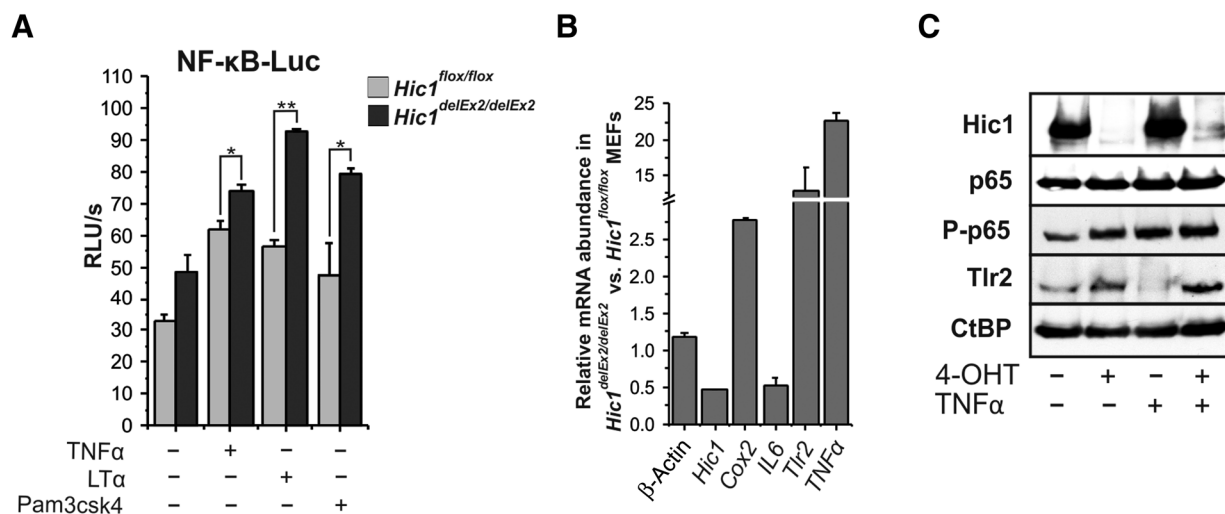
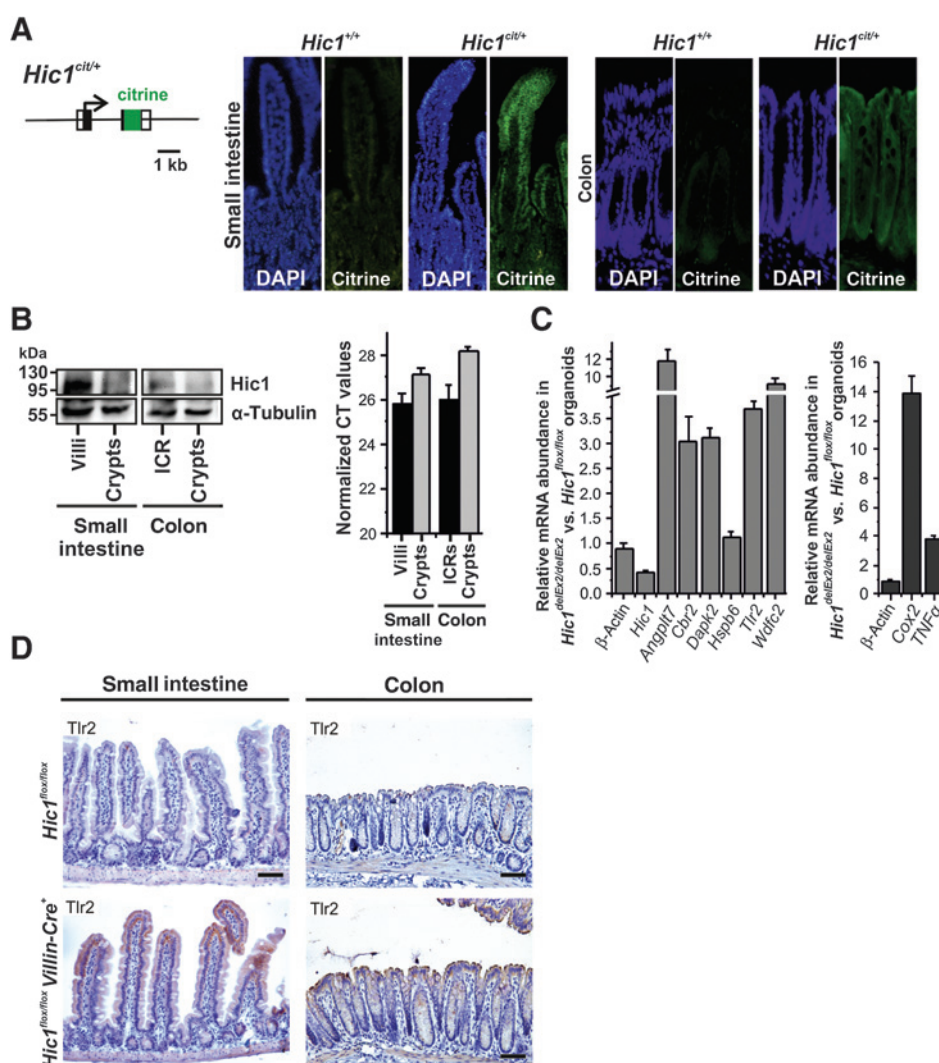


Figure 2.

Hic1-deficient MEFs display upregulated NF- κ B signaling. A, luciferase reporter assays in MEFs cultured with 4-OHT or vehicle (ethanol) for 3 days and then electroporated with the NF- κ B-Luc reporter. Six hours upon electroporation, TNF α , LT α , or Pam3csk4 was added to the culture medium and the cells were harvested 12 hours later. The assay was performed in triplicates, representative results are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. B, qRT-PCR analysis of putative target genes of NF- κ B signaling *Cox2*, *IL6*, and *TNF α* in *Hic1*-deficient or control vehicle-treated MEFs. Total RNA was isolated from cells cultured with 4-OHT or vehicle for 3 days and then stimulated with the indicated ligand overnight. The results were normalized to the *Ubiquitin B (Ubb)* housekeeping gene; the relative expression of another housekeeping gene, *β -actin*, is also shown. The expression level of the respective gene in control vehicle-treated cells was arbitrarily set to 1. The analysis was performed in triplicates; error bars: SDs. C, immunoblotting of lysates prepared from MEFs cultured with 4-OHT or vehicle for 3 days and then stimulated with TNF α for 30 minutes. The experiment was repeated twice, representative blot is presented. CtBP, loading control; P-p65, immunoblotting with an antibody recognizing p65 phosphorylated at S536.

Janeckova et al.

**Figure 3.**

Increased expression of *Tlr2* in *Hic1*-deficient small intestinal organoids and intestinal epithelia. A, production of *Hic1*-citrine fusion protein in *Hic1^{cit/+}* mouse is restricted to the epithelium of the small intestine and colon. Left, a scheme of the *Hic1*-citrine reporter allele producing citrine fluorescent protein from the *Hic1* locus. Exons are depicted by boxes; coding sequences are filled, arrow indicates the transcription start site. Right, fluorescent microphotographs of cryosections of the small intestine and colon of *Hic1^{+/+}* and *Hic1^{cit/+}* mouse counterstained with DAPI nuclear stain (blue fluorescence). The right image from each pair was gained in "citrine" (green fluorescence) channel to monitor expression from the *Hic1* locus. No citrine fluorescence was observed in the intestine of control *Hic1^{+/+}* animals. B, left, Western blotting from separated epithelial lining of the wt small intestinal villi and crypts and from the wt intercrypt regions (ICRs) and crypts of the colon; α -tubulin, loading control. Right, qRT-PCR analysis of total RNA isolated from the indicated regions of the intestinal epithelium. Cycle threshold (C_t) values normalized to *Ubb* are shown. C, qRT-PCR analysis of RNA isolated from organoids established from the small intestinal crypts of *Hic1^{lox/lox}* *Villin-CreERT2⁺* mice. Vehicle (EtOH) or 4-OHT was added to the culture medium third day after the crypt isolation and the organoids were harvested after another 3 days. The expression level of the respective gene in vehicle-treated organoids was arbitrarily set to 1. The scheme represents results obtained in two independent experiments (each) performed in triplicates. Errors bars: SDs. D, IHC staining of *Tlr2* [brown 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) stain] in *Hic1^{lox/lox}* and *Hic1^{lox/lox}* *Villin-Cre⁺* intestines. The specimens were counterstained with hematoxylin (blue nuclear stain). Scale bar: 0.15 mm.

expression profiling of sorted Paneth cells isolated from the *Hic1^{lox/lox}* *Villin-Cre⁺* and control (*Hic1^{lox/lox}*) small intestinal crypts, we observed a significant increase in *Atoh1*, *Sox9*, and *Thr2* mRNA levels upon loss of *Hic1*. Moreover, FACS analysis showed a slight increase in Paneth cell counts in *Hic1^{lox/lox}* *Villin-Cre⁺* animals (Fig. 4A). Increased Paneth cell numbers along the rostro-caudal axis of the small intestine were also recorded using paraffin sections stained with an antibody recognizing Paneth cell-specific marker lysozyme (Fig. 4B). In addition, the numbers of mucin-producing goblet cells and chromogranin A-positive enteroendo-

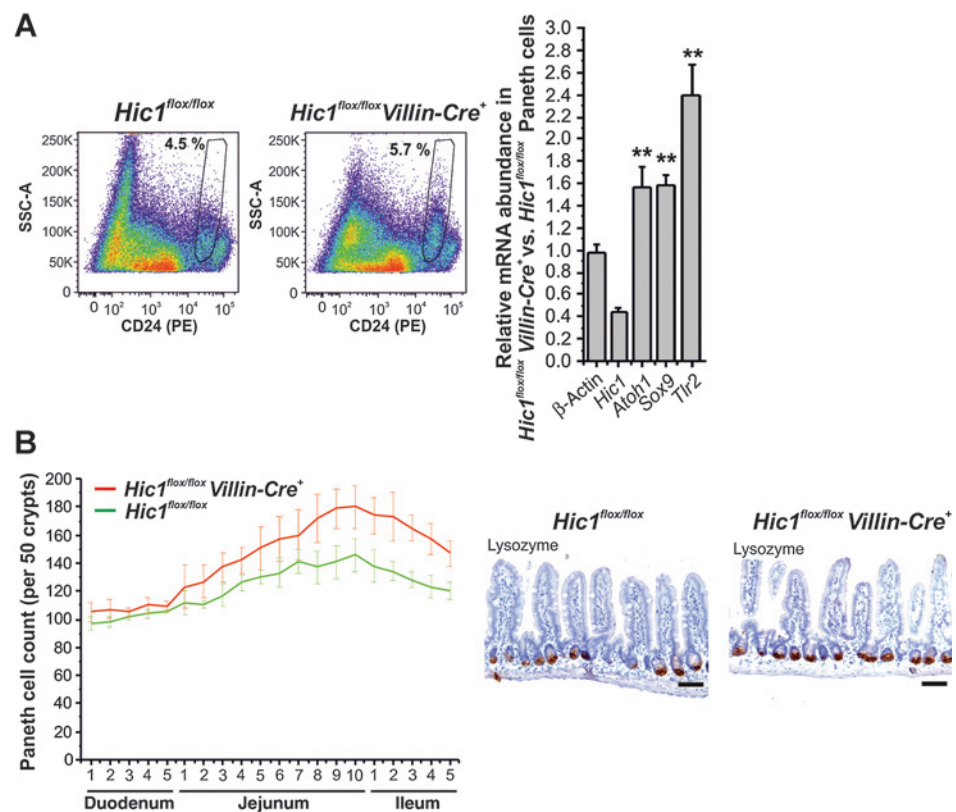
crine cells were also elevated. In contrast, the differentiation and number of absorptive enterocytes seemed unchanged in the *Hic1*-deficient intestine (Supplementary Fig. S2).

Loss of *Hic1* promotes colitis-associated tumorigenesis

Recently, Mohammad and colleagues described accelerated formation of tumors upon loss of *Hic1* in the *Apc^{Min/+}* mouse model of intestinal cancer (39). Because inflammation is an important tumor promoter in colorectal neoplasia, the role of *Hic1* was examined utilizing colitis-associated tumorigenesis. In

Figure 4.

Loss of the Hic1 function results in increased counts of Paneth cells. A, left, FACS analysis of Paneth cells obtained from the indicated mouse strains. Representative histograms show higher numbers of Paneth cells in the Hic1-deficient small intestine. Four animals per strain were used for the experiment. Right, qRT-PCR of sorted Paneth cells. Decreased *Hic1* expression results in upregulation of Hic1 target genes *Atoh1*, *Sox9*, and *Tlr2*. The expression level of the respective gene in *Hic1* wt cells was arbitrarily set to 1. **, $P < 0.01$. B, Paneth cell distribution in the indicated segments of the small intestine. Specimens obtained from four *Hic1^{fllox/fllox}* and four *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺* mice were stained using an anti-lysozyme antibody to visualize Paneth cells (right images). Lysozyme-positive cells were counted in 50 neighboring crypts in several different fields indicated by numbers on the x-axis. Scale bar: 0.15 mm; error bars: SDs.

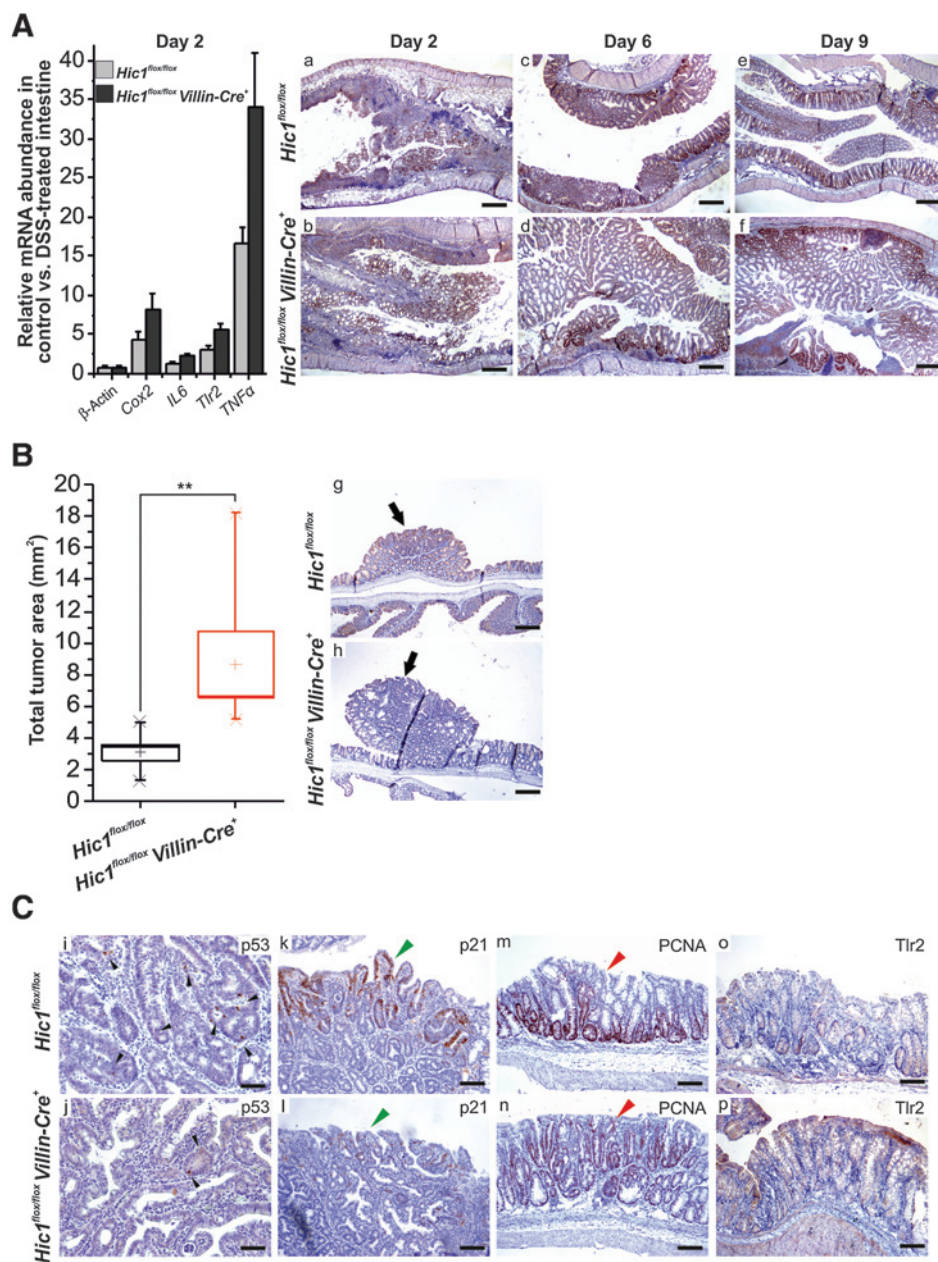


the acute colitis phase – induced by DSS treatment – no differences in the extent of tissue damage were observed in histologic specimens obtained from *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺* and *Hic1^{fllox/fllox}* mice. However, *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺* individuals displayed more robust DSS treatment-associated transcriptional response of the *Cox2*, *Thr2*, and *TNF α* genes, that is, genes upregulated upon Hic1 loss. Analysis of the colon during the regenerative phase, that is, 6 and 9 days upon DSS withdrawal, showed a more robust hyperproliferative response of the colonic epithelium of *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺* individuals when compared with their *Hic1^{fllox/fllox}* littermates (Fig. 5A). Moreover, a continuous increase of *Cox2*, *Thr2*, and *TNF α* expression was observed at these time points (Supplementary Fig. S3). Strikingly, upon combined AOM/DSS treatment, Hic1 deficiency significantly increased the size of colonic and rectal tumors (Fig. 5B; average tumor size in *Hic1^{fllox/fllox}* mouse = 3.1 mm² vs. 8.7 mm² in *Hic1^{fllox/fllox} Villin-Cre⁺*; $P = 0.00862$). IHC examination revealed decreased numbers of p53-positive cells within the tumor mass of *Hic1*-negative mice. Nevertheless, even in *Hic1^{fllox/fllox}* mice, cells displaying nuclear p53 staining were rare and scattered throughout the neoplastic tissue. However, expression of the p21 cell-cycle inhibitor, the most prominent in wt cells at the surface area of the tumors, was reduced in *Hic1* knock-outs. Strikingly, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expressing cells were localized in wt mice in areas clearly distinguished from the regions containing p21-positive cells. In contrast, in Hic1-deficient mice, proliferating cells were more abundant and dispersed throughout the neoplastic tissue. Finally, no differences were noted in the numbers of apoptotic cells (Fig. 5C and not shown).

Discussion

In the present study, we used a gene inactivation-based screen to identify genes regulated by the Hic1 tumor suppressor. Interestingly, none of the identified presumptive Hic1 target genes was described previously. As the expression of all tested genes reacted to the Hic1 presence not only in MEFs, but also in intestinal organoids, we can exclude the possibility that the genes represent a small (sub)set of tissue-specific Hic1 targets. More likely, because the majority of previous studies utilized cells (over)producing ectopic HIC1 or cells treated with HIC1-specific siRNA (33), we suggest that (our) genes represent Hic1 target genes whose expression is relieved when the Hic1 steady-state levels are diminishing. On the other hand, the previously identified targets might represent genes efficiently repressed (or activated) immediately upon perturbation of the Hic1 protein levels. We used Hic1-reporter mice, Western blotting, and FACS analysis to demonstrate that in the adult intestine, Hic1 is mainly expressed in the differentiated epithelial cells. The expression of its target gene, *Tlr2*, was documented in ISCs (19). However, in the Hic1-deficient gut, *Tlr2* was upregulated in differentiated cells, confirming the inverse Hic1-*Tlr2* relationship. Moreover, intestinal ablation of *Hic1* resulted in a moderate increase in Paneth, goblet, and enteroendocrine cell numbers. Such phenotype might be attributed to upregulation of *Atoh1*, the Hic1 target gene functioning as the master regulator of secretory cell lineages in the small intestine (14). Upon ligand binding, *Tlr2* triggers several signal transduction pathways, including NF- κ B signaling (17). Interestingly, qRT-PCR analysis and luciferase reporter assays revealed that not only

Janeckova et al.

**Figure 5.**

Hic1 deficiency increased the size of colonic tumors generated upon AOM/DSS treatment. A, acute colitis and regeneration after DSS treatment. Left, DSS-induced transcriptional response in the colon of *Hic1^{fl/fl}* and *Hic1^{fl/fl} Villin-Cre⁺* mice 2 days upon DSS withdrawal. The expression level of the corresponding genes in mice without DSS treatment was arbitrarily set to 1. Four animals for each genotype were analyzed. Right, representative microscopic images of the colon two (a, b), six (c, d) and nine (e, f) days upon DSS withdrawal. The specimens were stained using an anti-PCNA antibody to detect proliferative cells (brown nuclear precipitate) and counterstained with hematoxylin (blue nuclear staining). B, tumor size in the colon generated in the indicated mouse strains upon combined AOM/DSS treatment. Intestines dissected from seven animals in each group were analyzed 5 weeks after the AOM/DSS application. Left, quantification of the total tumor area indicating significantly increased tumor burden in the *Hic1*-deficient colon. The total tumor area determined in each individual is indicated in the boxplots. The boxed areas correspond to the second and third quartiles; the spread of the values is given by "whiskers" above and below each box. Median (transverse line) and mean (cross) is marked inside each box. **, $P < 0.01$; error bars: SDs. Right, representative microscopic images of the colon; neoplastic outgrowths are indicated by black arrows. The specimens were counterstained with hematoxylin and an anti- β -catenin antibody. C, IHC detection of tumor suppressor p53 [black arrowheads in (i) and (j)], cell-cycle inhibitor p21 [green arrowheads in (k) and (l)], PCNA-positive [(m, n); red arrowheads indicate differentially stained tumor surface] and Tlr2-producing (o, p) cells in colonic tumors. Scale bar: 0.75 mm (a-h); 0.15 mm (i, j); 0.3 mm (k-p).

ligand-induced, but also basal levels of the NF- κ B signaling are elevated in *Hic1*-deficient cells (Fig. 2A and B). As the NF- κ B pathway activity was more pronounced even in cells stimulated with other NF- κ B inducers, the observed NF- κ B (hyper)activity cannot be solely attributed to the increase in Tlr2 expression or function. Indeed, Western blotting confirmed that *Hic1^{delEx2/delEx2}* cells displayed higher amounts of phosphorylated nuclear NF- κ B mediator p65 (Fig. 2C). The exact reason(s) why *Hic1* deficiency potentiates NF- κ B signaling remains to be determined. Nevertheless, since several studies reported interaction between the STAT3 and NF- κ B pathways (reviewed in ref. 40), we suggest that the autocrine IL6-STAT3 signaling might also be linked to the observed "boosts" in cellular reactivity to the stimuli activating the NF- κ B pathway and to the increase in p65 stability and phosphorylation.

Several studies have demonstrated that *Tlr2* expression is increased during intestinal inflammation (41) or in human patients with ulcerative colitis (42). In addition, Maeda and colleagues showed that conditioned medium obtained from cultured colon cancer cells might activate NF- κ B signaling via Tlr2 (43). These data are in accordance with our observation that in damaged tissue, transcription of *Tlr2* and genes linked to active NF- κ B signaling is elevated. Importantly, in the *Hic1*-deficient colon, the damage-induced transcriptional response was more robust than in wt mice, supporting the *Hic1* repressive role in *Tlr2* expression and NF- κ B activation (Fig. 5A and Supplementary Fig. S3). Interestingly, several recent studies reported decreased tumor burden in *Apc^{+/Min}* mice deficient in Tlr2 or its intracellular adaptor myeloid differentiation primary response protein-88 (Myd88; refs. 19, 44). Furthermore, deletion of *Tlr2* (or *Myd88*) reduced development of

colonic tumors in DSS-treated animals. Moreover, functional blocking of TLR2 inhibited *in vitro* growth of cancer cells (19). In another study, epithelial expression of Tlr2 and Tlr2/NF- κ B signaling promoted growth and survival of gastric cancer cells (17). In summary, all these results support the cell-autonomous and inflammation-independent role of Tlr2 in cancer.

HIC1 participates in the cellular network regulating the DNA damage response (7). HIC1-mediated repression of deacetylase *SIRT1* gene promotes p53 stability and potentiates transcription of p53-dependent genes such as *p21* (45) and, in a positive regulatory feedback loop, also *HIC1* itself (1, 46). Unexpectedly, only a small fraction of cells in tumors generated by AOM/DSS treatment displayed stabilized p53 (Fig. 5C). Although the portion of p53-positive cells was decreased in *Hic1*^{-/-} neoplastic tissues, it is unlikely that the increased tumor size observed upon *Hic1* deletion is linked to the attenuated p53-mediated response. In human cells, HIC1 directly represses transcription of the *CDKN1A* gene encoding p21 (33). Strikingly, in *Hic1*-deficient tumors, we observed the opposite effect of *Hic1* absence, that is, reduced p21 staining (Fig. 5C). Nevertheless, the observed discrepancy of the results might be explained by the fact that next to p53 and HIC1, p21 levels might be controlled by many other stimuli and also by post-transcriptional mechanisms (reviewed in ref. 47). As we noted increased cell proliferation upon DSS-induced epithelial damage and in *Hic1*-negative AOM/DSS tumors, we suggest that besides compromising the p53-mediated tumor-suppressive mechanisms the loss of *Hic1* might potentiate tumor-promoting proliferative Tlr2/NF- κ B signaling.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

1. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, et al. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nat Med* 1995;1:570–7.
2. Carter MG, Johns MA, Zeng X, Zhou L, Zink MC, Mankowski JL, et al. Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* 2000;9:413–9.
3. Chen WY, Zeng X, Carter MG, Morrell CN, Chiu Yen RW, Esteller M, et al. Heterozygous disruption of *Hic1* predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nat Genet* 2003;33:197–202.
4. Rood BR, LePrince D. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:811–27.
5. Pinte S, Stankovic-Valentin N, Deltour S, Rood BR, Guerardel C, LePrince D. The tumor suppressor gene HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is a sequence-specific transcriptional repressor: definition of its consensus binding sequence and analysis of its DNA binding and repressive properties. *J Biol Chem* 2004;279:38313–24.
6. Guerardel C, Deltour S, Pinte S, Monte D, Begue A, Godwin AK, et al. Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53. *J Biol Chem* 2001;276:3078–89.
7. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates *SIRT1* to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005;123:437–48.
8. Valenta T, Lukas J, Doubravska L, Fafilek B, Korinek V. HIC1 attenuates Wnt signaling by recruitment of TCF-4 and beta-catenin to the nuclear bodies. *EMBO J* 2006;25:2326–37.
9. Clevers HC, Bevins CL. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol* 2013;75:289–311.
10. Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 2014;26:570–9.
11. De Sousa EMF, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013;19:614–8.
12. Briggs KJ, Eberhart CG, Watkins DN. Just say no to ATOH: how HIC1 methylation might predispose medulloblastoma to lineage addiction. *Cancer Res* 2008;68:8654–6.
13. Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, et al. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *J Biol Chem* 2009;284:20927–35.
14. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* 2011;192:767–80.
15. Pospichalova V, Tureckova J, Fafilek B, Vojtechova M, Krausova M, Lukas J, et al. Generation of two modified mouse alleles of the *Hic1* tumor suppressor gene. *Genesis* 2011;49:142–51.
16. Kim S, Karin M. Role of TLR2-dependent inflammation in metastatic progression. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:191–206.
17. Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormack W, Hughes N, et al. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell* 2012;22:466–78.
18. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* 2008;20:518–23.
19. Scheeren FA, Kuo AH, van Weele LJ, Cai S, Glykofridis I, Sikandar SS, et al. A cell-intrinsic role for TLR2-MYD88 in intestinal and breast epithelia and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 2014;16:1238–48.

Authors' Contributions

Conception and design: L. Janeckova, V. Pospichalova, V. Korinek
Development of methodology: V. Pospichalova, M. Dubuissez, D. LePrince, A. Hlavata, V. Korinek
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): L. Janeckova, V. Pospichalova, M. Vojtechova, J. Tureckova, J. Dobes, M. Dubuissez, D. LePrince, N. Baloghova, M. Horazna, A. Hlavata, J. Stancikova, E. Sloncova
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): L. Janeckova, V. Pospichalova, A. Hlavata, H. Strnad, V. Korinek
Writing, review, and/or revision of the manuscript: L. Janeckova, V. Pospichalova, D. LePrince, V. Korinek
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): K. Galuskova
Study supervision: V. Korinek

Acknowledgments

The authors thank S. Robine for Villin-Cre and Villin-CreERT2 mice, and S. Takacova for critically reading the manuscript.

Grant Support

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic Grant No. P305/12/2347, institutional Grant No. RVO 68378050, and project BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) from the European Regional Development Fund.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received January 19, 2015; revised March 20, 2015; accepted April 1, 2015; published OnlineFirst May 1, 2015.

Janeckova et al.

20. el Marjou F, Janssen KP, Chang BH, Li M, Hindie V, Chan L, et al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 2004;39:186–93.
21. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262–5.
22. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423:448–52.
23. Melenovsky V, Benes J, Skaroupkova P, Sedmera D, Strnad H, Kolar M, et al. Metabolic characterization of volume overload heart failure due to aorto-caval fistula in rats. *Mol Cell Biochem* 2011; 354:83–96.
24. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013;14:128.
25. Dubuissez M, Faiderbe P, Pinte S, Dehennaut V, Rood BR, Leprince D. The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440:424–30.
26. Faflek B, Krausova M, Vojtechova M, Pospichalova V, Tumova L, Sloncová E, et al. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with Lgr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology* 2013;144:381–91.
27. Waaler J, Machon O, Tumova L, Dinh H, Korinek V, Wilson SR, et al. A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res* 2012;72:2822–32.
28. Doubravska L, Krausova M, Gradl D, Vojtechova M, Tumova L, Lukas J, et al. Fatty acid modification of Wnt1 and Wnt3a at serine is prerequisite for lipidation at cysteine and is essential for Wnt signalling. *Cell Signal* 2011;23:837–48.
29. Lukas J, Mazna P, Valenta T, Doubravska L, Pospichalova V, Vojtechova M, et al. Dazap2 modulates transcription driven by the Wnt effector TCF4. *Nucleic Acids Res* 2009;37:3007–20.
30. Kerr MK. Linear models for microarray data analysis: hidden similarities and differences. *J Comput Biol* 2003;10:891–901.
31. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 2007;445:661–5.
32. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4324–7.
33. Dehennaut V, Loison I, Boulay G, Van Rechem C, Leprince D. Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430: 49–53.
34. Slattery ML, Herrick JS, Bondurant KL, Wolff RK. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *Int J Cancer* 2012;130:2974–80.
35. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003; 22:3307–18.
36. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggestt S, Devaux B, Radolf JD, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736–9.
37. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, et al. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000;164:554–7.
38. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 2001;166:2018–24.
39. Mohammad HP, Zhang W, Prevas HS, Leadem BR, Zhang M, Herman JG, et al. Loss of a single Hic1 allele accelerates polyp formation in Apc (Delta716) mice. *Oncogene* 2011;30:2659–69.
40. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:11–9.
41. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;122:1987–2000.
42. Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2008;56:267–74.
43. Maeda S, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Hirata Y, Hayakawa Y, et al. Colon cancer-derived factors activate NF-kappaB in myeloid cells via TLR2 to link inflammation and tumorigenesis. *Mol Med Rep* 2011; 4:1083–8.
44. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* 2007;317: 124–7.
45. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817–25.
46. Britschgi C, Rizzi M, Grob TJ, Tschan MP, Hugli B, Reddy VA, et al. Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene* 2006;25:2030–9.
47. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009;9:400–14.