

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

Année 2016

THESE D'UNIVERSITE  
Mention Biochimie et Biologie Moléculaire

**Le suppresseur de tumeur HIC1 est une nouvelle  
cible directe de la kinase ATM et un acteur  
multifonctionnel de la réponse cellulaire aux  
cassures double brin (DSBs) de l'ADN**

Présentée et soutenue publiquement par

Sonia PAGET

A Lille, le 15 décembre 2016

**Jury de Thèse**

Pr Tony LEFEBVRE

Dr Fabrice GOUILLEUX

Pr Olivier COQUERET

Dr Josée GUIROUILH-BARBAT

Dr Dominique LEPRINCE

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



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

Année 2016

THESE D'UNIVERSITE  
Mention Biochimie et Biologie Moléculaire

**Le suppresseur de tumeur HIC1 est une nouvelle  
cible directe de la kinase ATM et un acteur  
multifonctionnel de la réponse cellulaire aux  
cassures double brin (DSBs) de l'ADN**

Présentée et soutenue publiquement par

Sonia PAGET

A Lille, le 15 décembre 2016

**Jury de Thèse**

Pr Tony LEFEBVRE

Dr Fabrice GOUILLEUX

Pr Olivier COQUERET

Dr Josée GUIROUILH-BARBAT

Dr Dominique LEPRINCE

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse





## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur Yvan de Launoit pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR8161 et de m'avoir permis d'effectuer cette magnifique thèse !

Je remercie l'Université de LILLE 1, la Région Nord Pas De Calais et l'Association pour la Recherche sur la Cancer (ARC) pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse pour avoir consacré du temps à lire mon manuscrit et pour avoir accepté de faire partie de ce jury :

- Le Dr Fabrice GOUILLEUX et le Professeur Olivier COQUERET, en tant que rapporteur.

- Le Dr Josée GUIROUILH-BARBAT en tant qu'examineur. Je la remercie pour avoir contribué à l'obtention d'une partie des résultats de mes travaux de thèse.

- Le Professeur Tony LEFEBVRE, en tant que Président de ce jury. Je le remercie également pour m'avoir suivi tout au long de cette aventure en tant que membre de mes différents CST annuels.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Dominique LEPRINCE plus connu sous le nom de « CHEF » (même si je sais que vous n'aimez pas du tout cette appellation...) pour m'avoir accueilli dans son équipe quasi exclusivement féminine ! Merci de m'avoir encadré tout au long de ces 4 dernières années et de m'avoir initié à la joie du clonage !! Grace à vous, j'ai appris à avoir plus confiance en moi. En cours de parcours, j'ai rejoint votre bureau mais ce ne fut pas si terrible que ça ! Vous êtes un chef plutôt cool et très à l'écoute et je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi !

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe HIC1.

Ma petite et « grande » INGRID. C'est toi qui m'a prise sous ton aile quand j'ai débarqué en tant que petite M2 en 2012..... Et oui, le temps passe vite ! Je ne connaissais quasi rien aux techniques de biologie cellulaire et tu m'as tout appris. Aujourd'hui, tu es devenue une superbe amie, toujours présente pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu es une fille géniale et à l'écoute de tout

le monde !!! En apprenant à te connaître, j'ai vite aperçu ton côté de super créatrice ! Ces petits moments « purement filles » ont permis de détendre l'atmosphère quand tout allait mal du côté des manips !!! Et oui, tout n'est pas si facile que ça en science ! Merci d'avoir réalisé de très nombreuses manips pour moi surtout lorsque j'écrivais ce super manuscrit !!!!! Et n'oublions surtout pas ton humour décalé qui nous a permis de travailler dans une ambiance plus que sympathique tout au long de ces 4 dernières années !

Très chère Marion, quand je t'ai connue, tu étais dans la même galère que moi, EN THESE, mais notre super équipe a fait que ce ne fut pas si terrible que ça !!! Tu m'as appris beaucoup de choses et surtout la fameuse manip de ChIP qPCR, qui j'avoue n'est pas vraiment ma technique préférée... Nous avons également effectué plusieurs petits voyages ensemble très enrichissants, en particulier notre super congrès à BUDAPEST, plutôt sympa comme destination (Merci CHEF ☺). Aujourd'hui, tu effectues un post-doc au CANADA et tu ne pourras donc pas assister à ma soutenance... DOMMAGE, tu sauras la fin de l'histoire HIC1 et dommages à l'ADN en lisant ma superbe thèse !

Je tiens également à remercier Sébastien Pinte, qui est maintenant professeur des écoles. Tu as contribué à l'obtention d'une partie de mes résultats. Même si ton passage dans l'équipe fut court, tu m'as été d'une grande aide dans l'avancée de mes travaux de thèse.

Vanessa, je t'ai connue en mi-parcours en tant que Maître de conférence. Cette thèse est la suite de ton travail de post doctorat, c'est donc toi qui a initié ce travail. Je te remercie pour tes conseils et ta « bonne humeur », et oui tu t'es assagie !!! car apparemment tu avais un caractère bien trempé et une tendance à péter les plombs lorsque tu étais en post-doc dans l'équipe ☺. Heureusement, je n'ai pas connu ça, car comme tu le sais pour moi, tout est beau, tout est rose comme chez les Bisounours !!

Et la petite dernière, Nathalie ! J'ai adorée passer ces deux dernières années avec toi. Ta bonne humeur et ta sympathie ont été bien plus qu'appréciable (Pierre Richard ☺) !!! Je n'oublierai jamais nos fous rires et ton arrivée dans l'équipe ! N'oublions pas non plus tous les petits mots de tendresse que tu me laissais sur ma paillasse quand je partais en vacances !!

Et toi Mandy, j'ai eu la chance de te connaître au cours de ma dernière année de licence et je voulais simplement te dire que tu es une fille géniale ! Je te considère comme une véritable amie ! Toi aussi tu t'es lancée dans la folle aventure de la thèse, je te souhaite beaucoup de courage et de réussite ! Je te remercie car ton soutien fut plus qu'appréciable dans les bons moments mais également dans les périodes plus difficiles, et je ne pourrais jamais te remercier assez !!!! J'ai adoré passer tous ces moments avec toi, nos trajets de la gare Lille Flandres jusqu'au Labo tous les matins, nos pauses déjeuners et tous les autres moments où l'on se plaignait des manip « pourries » qui marchent pas ! mais bon nous avons appris à vivre avec ! C'est ça la Science ! Ah oui, j'allais oublier, le jour où tu deviendras « Miss Olympia » n'oublie pas de m'appeler ☺!!

Je ne t'oublie pas ma petite Nicole, plus qu'une secrétaire, tu es une Wonder woman !!! Toujours au taquet quand on a besoin de toi. Je n'oublierais pas non plus tous nos super échanges de mails purement professionnels, toi seule sait !!

Je remercie l'équipe voisine ICE pour leur bonne humeur au quotidien et en particulier Joe pour m'avoir appris la super technique de « comet assay » !

Je remercie également tous mes autres collègues de travail avec lesquels j'ai pu discuter dans les fameux couloirs de l'IBL du R+3 et aussi ceux avec qui j'ai partagé les pauses déjeuners à 11h30 précisément !

Merci aux amis, Aminata, Hajer, Balou, Hanane, Nora, Mess et Fanny pour m'avoir soutenue tout au long de cette aventure. Et plus particulièrement à toi Hajer, meilleure amie depuis toujours, je te dédie en partie cette thèse, ton soutien et tes encouragements m'ont aidé à tenir bon jusqu'au bout !

Enfin, un énorme merci à ma famille, vous m'avez apporté énormément à votre façon ! En particulier toi Sarah qui comme tu le dit souvent : « t'es trop forte ma sœur ». Et surtout merci à toi Sylvain, même si tu ne comprends pas grand-chose de mon travail. Tu as vraiment été conciliant avec moi et c'est grâce à toi si aujourd'hui j'y suis arrivée !

## Résumé

Le gène HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) est un gène suppresseur de tumeur situé en 17p13.3, une région hyperméthylée ou délétée dans de nombreux cancers. HIC1 code un répresseur transcriptionnel caractérisé par plusieurs domaines fonctionnels. La région centrale contient un motif conservé important pour la répression des gènes cibles de HIC1, le motif MK<sup>314</sup>HEP au sein duquel la Lysine 314 est soit SUMOylée soit acétylée.

HIC1 est au centre de boucles de régulation complexes mettant en jeu le gène suppresseur de tumeur *TP53* et la désacétylase *SIRT1* entre autres. En effet *HIC1* et *SIRT1* sont deux gènes cibles directs de P53. Cependant, la désacétylation de P53 par SIRT1 l'inactive. Par contre, en réponse aux cassures double brin de l'ADN (DSBs) non réparables, HIC1 réprime l'expression de SIRT1 favorisant ainsi l'apoptose médiée par p53. De plus, dans ces conditions, on observe une augmentation de la SUMOylation de la Lysine 314 de HIC1 de manière dépendante de la kinase ATM, ce qui favorise l'interaction avec le complexe répresseur NuRD.

HIC1 joue également un rôle important dans la réparation des DSBs. En effet, l'invalidation de HIC1 par siRNA dans des fibroblastes humains induit une réparation plus lente des DSBs comme l'ont montré des « essais comètes », qui mesurent la persistance d'ADN endommagé au cours du temps. De plus, des « essais comètes » réalisés avec un mutant non-SUMOylable, HIC1 E316A ont montré que la SUMOylation de HIC1 n'était pas nécessaire pour la réparation des DSBs. Par contre, dans ces conditions, nous avons identifié et validé un site potentiel de phosphorylation de HIC1, **LS**<sup>694</sup>QG par des kinases de la famille PIKK (Phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases) (ATM, ATR et DNA-PKcs) activées lors de la détection de dommages à l'ADN. Ainsi, dans des fibroblastes humains BJ-hTERT, la protéine HIC1 est rapidement phosphorylée par ATM en présence de DSBs réparables. Des «essais comètes» réalisés avec le mutant non phosphorylable S694A, ont démontré l'importance de cette phosphorylation dans le processus de réparation. De plus, nous avons montré que la phosphorylation de la Sérine 694 permettait le décrochage de la protéine HIC1 de la chromatine pour se relocaliser au niveau du nucléoplasme. Cependant, la surexpression des protéines HIC1 WT ou HIC1S694A n'a pas d'impact sur l'efficacité de la réparation par NHEJ ou HR comme l'ont montré des expériences

qui mesurent l'efficacité de ces deux mécanismes en utilisant l'enzyme I-Sce1 pour induire des DSBs. De ce fait, en réponse aux dommages à l'ADN réparables, deux mécanismes sont alors envisageables. Premièrement la phosphorylation de la Sérine 694 permettrait le décrochage de HIC1 au niveau de l'hétérochromatine pour permettre la relaxation de la chromatine et faciliter le recrutement des protéines de réparation comme c'est le cas pour le corépresseur Kap1, et deuxièmement, la protéine HIC1 jouerait son rôle de répresseur transcriptionnel classique en présence de DSBs réparables au niveau de l'euchromatine en réprimant *P21* et *PUMA*, deux gènes cibles de p53.

HIC1 joue donc un rôle différent dans la réponse aux cassures double-brin de l'ADN en fonction de leur intensité et de leur localisation sub-nucléaire. En effet, au niveau de l'hétérochromatine, HIC1 faciliterait la réparation des DSBs par un mécanisme impliquant la relaxation de la chromatine. D'autre part, au niveau de l'euchromatine, HIC1 agirait en tant que répresseur transcriptionnel classique pour contrecarrer l'effet de la protéine p53 et permettre la reprise du cycle cellulaire si les dommages sont réparables. Par contre, en présence de DSBs non réparables, HIC1 favoriserait la réponse apoptotique dépendante de P53 en inhibant SIRT1. Ainsi, l'implication de HIC1 dans la réparation des DSBs permettra de mieux comprendre sa fonction de gène suppresseur de tumeurs.

## **ABSTRACT**

The tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated in Cancer 1*) is located on chromosome 17 in 17p13.3, a region frequently hypermethylated or deleted in many cancers.

*HIC1* encodes a transcriptional repressor characterized by several functional domains. In the central region, the conserved MK<sup>314</sup>HEP motif is an Acetylation/SUMOylation switch motif centered on K314 which regulates the recruitment of MTA1, a component of NuRD repressor complexes.

A regulatory feedback loop between HIC1, SIRT1 and P53 has been described. *HIC1* and SIRT1 are direct targets genes of P53. HIC1 directly represses the transcription of *SIRT1*, a histone deacetylase (HDAC) that deacetylates and inactivates P53, thereby modulating P53-dependent DNA damage responses. SIRT1 also deacetylates HIC1 but, in contrast to P53, this deacetylation activates HIC1 by strengthening its transcriptional repression potential. Furthermore, after induction of non-repairable DSBs (DNA Double Strand Breaks) (treatment with etoposide for 16h), we observed a SUMOylation increase dependant on the ATM kinase.

Moreover, HIC1 also plays an important role in the repair of DSBs. Indeed, invalidation of *HIC1* by RNA interference (siRNA) in normal human fibroblasts induced a slower repair of DSBs, as measured by functional comet assays. Furthermore, comet assays with a non SUMOylable HIC1 point mutant (E316A) demonstrated that SUMOylation of Lysine K314 is dispensable for DNA repair.

In addition, upon induction of repairable DNA damage (treatment with etoposide for 1h), we have identified by *in silico* analyses and confirmed by proteomic analyses, a potential phosphorylation site "LS<sup>694</sup>QG" for the PIKK family kinases (phosphatidylinositol 3 - kinase -related kinase) ATM and DNA-PKcs which are activated upon detection of DSBs. Moreover, we have shown that HIC1 is rapidly and specifically phosphorylated by ATM upon DNA damage induction in normal human fibroblasts (BJ-hTert). Furthermore, comet assays with a non phosphorylable HIC1 point mutant (HIC1S694A) have shown that this phosphorylation is very important for the contribution of HIC1 to the repair of DSBs. However, overexpression of HIC1 WT or HIC1S694A does not impact on the efficacy of DNA repair by NHEJ or HR. We have also shown that phosphorylation of Serine 694 decreases the binding of HIC1 to chromatin. In fact, at sites of repairable DNA damage, HIC1 has two possible

mechanisms of action. When DSBs are located in heterochromatin, HIC1 S694 phosphorylation would allow heterochromatin relaxation to facilitate its repair, as shown for the co-repressor Kap1. When DSBs are located in euchromatin, HIC1 could repress transcription of genes including, P21 and PUMA, two direct targets genes of P53.

Thus, HIC1 plays different role during the DNA damage response to DNA double strand breaks depending on their intensity and their sub-nuclear location. Deciphering the HIC1 contribution to DNA repair will contribute to a better understanding of its tumor suppressor gene function.

# **Table des matières**



<b>Remerciements.....</b>	<b>5</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Tables des matières.....</b>	<b>12</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>17</b>
<b>Index des figures.....</b>	<b>20</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>25</b>
<b>I/ Les cassures simples et double brin de l'ADN.....</b>	<b>26</b>
<b>1/ Les cassures simple brin : origines de ces lésions.....</b>	<b>26</b>
1.1 Les sites abasiques.....	26
1.2 Les bases oxydées.....	26
<b>2/ Les cassures double brin (DSBs : DNA Double Strand Breaks).....</b>	<b>27</b>
2.1 Les cassures double brin programmées au cours du développement embryonnaire : la recombinaison des gènes VDJ.....	28
2.2 Les DSBs pendant la méiose.....	29
<b>3/ Les différentes sources à l'origine des cassures double brin de l'ADN.....</b>	<b>30</b>
3.1/ Les sources endogènes.....	30
3.2/ Les sources exogènes des DSBs, radiothérapie et chimiothérapie .....	30
<b>II/ Les principales voies de réparations des cassures double brin de l'ADN.....</b>	<b>31</b>
<b>1/ La recombinaison non homologue par ligation des extrémités ou non homologous end joining (NHEJ).....</b>	<b>31</b>
1.1 La signalisation de la voie classique c-NHEJ .....	32
1.1.1 La complexe multi protéique DNAPK : l'historique.....	32
1.1.2 Mécanisme cellulaire de la voie NHEJ classique.....	33
1.2 Rôle de la sous unité catalytique DNAPKcs dans le processus de réparation NHEJ.....	35
1.2.1 Structure de la sous unité catalytique.....	35
1.2.2 Modifications post-traductionnelles de DNAPKcs : les sites d'autophosphorylations.....	35
1.3 Rôle de la protéines Artémis, XLF et du complexe DNA ligase IV et XRCC4 dans l'étape de ligation de la NHEJ.....	38
1.3.1 La protéine Artémis dans le contexte des dommages à l'ADN...38	
1.3.2 L'étape de ligation médiée par le complexe XRCC4/DNA ligase IV et XLF.....	39
<b>2/ La recombinaison homologue ou HR.....</b>	<b>41</b>
2.1 Etape initiale de la recombinaison homologue : reconnaissance des cassures double brin et formation des foyers DNA Damage Response (DDR)	

2.1.1	Formation de la marque $\gamma$ H2AX.....	43
2.1.2	Le complexe MRN.....	45
2.1.2.1	La protéine Mre11.....	45
2.1.2.2	La protéine Rad 50.....	47
2.1.2.3	La protéine Nbs1 .....	48
2.2	Rôle de la protéine kinase ATM dans la recombinaison homologue.....	50
2.2.1	Structure de la protéine kinase ATM.....	51
2.2.2	Activation de la kinase ATM par le biais de modifications post-traductionnelles.....	51
2.2.3	Relation étroite entre la protéine kinase ATM et le complexe MRN	
2.2.4	Rôle de la kinase ATM au niveau du cycle cellulaire .....	56
2.2.4.1	Rôle lors du checkpoint G1/S.....	58
2.2.4.2	Rôle lors du checkpoint G2/M.....	59
<b>3/</b>	<b>D'autres modifications post-traductionnelles intervenant dans la réparation des DSB.....</b>	<b>60</b>
3.1	La SUMOylation.....	60
3.2	Quelques exemples de protéines SUMOylée au cours de la réparation des dommages à l'ADN.....	62
3.3	La O-GlcNAcylation.....	63
<b>4/</b>	<b>Régulation du choix du mécanisme de réparation NHEJ ou HR ?.....</b>	<b>63</b>
4.1	Importance du cycle cellulaire.....	64
4.2	Le rôle pivot des protéines BRCA1 et 53BP1.....	65
4.2.1	La protéine 53BP1.....	65
4.2.2	La protéine BRCA1.....	65
<b>III/</b>	<b>Rôle de la chromatine : un statut important au cours de la réparation de DSBs.....</b>	<b>67</b>
<b>1/</b>	<b>Qu'est-ce que la chromatine ?.....</b>	<b>67</b>
<b>2/</b>	<b>Rôle des histones dans le remodelage de la chromatine en présence de DSBs</b>	
2.1	Les différentes MPTs des histones .....	68
2.2	Les enzymes responsables des MPTs des protéines histones.....	68
2.3	Quelques exemples de MPTs des histones ayant un rôle dans la réparation de DSBs.....	71
<b>3/</b>	<b>Le dynamisme des nucléosomes en présence de dommages à l'ADN.....</b>	<b>73</b>
3.1	les différents complexes « remodeleurs » de la chromatine.....	73
3.2	Rôles principaux des complexes « remodeleurs » de la chromatine	
<b>4/</b>	<b>Le cas particulier de la réparation des DSBs au niveau de l'hétérochromatine</b>	

4.1 La protéine KAP1 va faciliter la relaxation de la chromatine via la protéine HP1 et l'acétyl transférase Tip60 .....	77
4.2 La protéine KAP1 va promouvoir la relaxation de la chromatine en se dissociant de la protéine CHD3.....	77

#### **IV/ Les dérégulations des différentes voies de réparation de l'ADN (HR ou NHEJ) conduisent à l'instabilité génomique et au développement de cancers.....81**

##### **1/ Mutations des gènes impliqués dans la réparation des DSBs observées dans les pathologies cancéreuses..... 81**

1.1 Mutations des gènes impliqués dans la recombinaison homologue.....	81
1.2 Dérégulations des gènes impliqués dans la réparation par ligation des extrémités NHEJ.....	82

##### **2/ Principaux traitements anti-cancéreux ciblant la DDR.....83**

2.1 La chimiothérapie en 1ère ligne de traitement .....	84
2.2 Les différents inhibiteurs des kinases de la famille PIKK.....	85
2.2.1 Inhibiteur de la kinase ATM.....	85
2.2.2 Inhibiteur du complexe multi-protéique DNA-PK.....	86
2.2.3 Inhibiteur des voies de réparation NHEJ et HR.....	87

##### **3/ Importance de l'épigénétique dans la stabilité génomique.....88**

3.1 Importance de la méthylation du génome .....	88
3.2 Remodeleurs de la chromatine et modifications des histones.....	88
3.3 Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs : Exemples des gènes suppresseurs de tumeur, <i>TP53</i> et <i>HIC1</i> .....	90

#### **V/ Le gène suppresseur de tumeur *HIC1* (Hypermethylated In Cancer 1)..... 91**

##### **1/ Découverte du gène *HIC1* .....**

##### **2/ structure génomique du gène *HIC1*..... 91**

##### **3/ Régulation de l'expression du gène *HIC1*..... 92**

3.1 Activation de la transcription de la protéine HIC1 par la protéine p53....	92
3.2 Activation de la transcription de la protéine HIC1 par la protéine E2F1..	93
3.3 Inactivation de l'expression de HIC1 par hyperméthylation de son promoteur	

##### **4/ *HIC1* un nouveau gène suppresseur de tumeur..... 94**

##### **5/ la protéine HIC1 est un répresseur transcriptionnelle..... 96**

5.1 Structure de la protéine HIC1.....	96
5.2 Rôle des différents domaines de la protéine HIC1.....	97
5.2.1 le Domaine BTB/POZ.....	97
5.2.2 Les motifs GLDLSKK et MKHEP de la région centrale.....	97

5.2.3 La région C-terminale de la protéine HIC1.....	98
5.3 Rôle de répresseur transcriptionnel.....	99
5.3.1 Recrutement du complexe NuRD.....	99
5.3.2 Recrutement du complexe PRC2.....	99
5.3.3 Recrutement de la protéine CtBP.....	100
5.3.4 Recrutement du complexe SWI/SNF.....	101
5.3.5 La protéine HIC1 réprime d'autres gènes.....	101
<b>6/ Rôle de la protéine HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....</b>	<b>103</b>
6.1 Rôle de HIC1 dans la réponse aux dommages non réparables.....	103
6.2 Rôle de HIC1 dans la réparation des DSBs.....	105
<b>RESULTATS .....</b>	<b>106</b>
1. <b>Publication 1</b> : "HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair but is essential for the apoptotic DNA-damage response (DDR) to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs)". (Paget et al., Oncotarget, en révision).....	108
2. <b>Publication 2</b> : (Paget et al., en préparation).....	177
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>225</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>246</b>
1. <b>Publication 3</b> : "Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of BCL11B at Serine 2 Negatively Regulates Its Interaction with NuRD Complexes during CD4+ T-Cell Activation". (Dubuissez et al., 2016 ; MCB)	

## ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléotidique

ATLD : Ataxia-Telangiectasia Like Disorder

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

alt-NHEJ : alternative NHEJ

ATOH1 : Atonal Homolog 1

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein

BLM : Bloom Syndrome protein

BRCA1 : Breast Cancer Associated 1

BRCT : **BRCA1 C-Terminal** domain)

BTB/POZ : *Broad complex, Tramtrack and Bric à brac*/Poxviruses and Zinc finger

CAK : Cdk Activating Kinase

CDK : Cyclin dependant kinase

CHD : Chromodomain Helicase DNA binding

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

CHK1 : Checkpoint Kinase 1

ChK2 : Checkpoint Kinase 2

CK2 : Casein Kinase II

c-NHEJ : classical-NHEJ

CtBP : C-terminal Binding Protein

DDR : DNA Damage Response

DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit

DSBs : Double strand breaks

EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2

FAT : FRAP, ATM et TRAPP

FATC : FAT C-terminal

*FGF-BP1* : Fibroblast Growth Factor-Binding Protein 1

FHA : Fork Head-Associated

HATs : Histones Acétyl Transférases

HDAC : Histones Désacétylases  
HEAT : Huntingtin-Elongation A subunit-Tor  
HEK : Human Embryonic Kidney  
HIC1 : Hypermethylated In Cancer 1  
HIRE : *HIC1 responsive element*  
HR : Homologous recombination  
INO80 : inositol requiring 80  
IR : Irradiation  
ISWI : imitation switch  
JMJD2A : Jumonji domain 2A  
KAP1 : KRAB [KRüppel Associated Box] domain Associated Protein 1  
L3MBTL1 : Lethal(3)malignant brain tumor-like protein  
LOH : Loss of Heterozygosity  
MEFs : mouse embryonic fibroblast  
MPT : Modification post-traductionnelle  
MRN : Mre11-Rad50-NBS1  
Mre : Meiotic recombinaison 11  
MTA1 : Metastasis Tumor Antigen 1  
NBS1 : Nijmegen breakage syndrome 1  
NBLD : Nijmegen breakage like disorder  
NDSM : Negatively charged amino acid-Dependent SUMOylation Motif  
NHEJ : Non Homologous End Joining  
NLS : Séquence de signalisation nucléaire  
NuRD : Nucleosome and Remodeling deacetylase  
OGA : O-GlcNAcase  
OGT : O-linked N-acetyl-glucosaminyltransferase  
PC2 : Polycomb group  
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT  
PIKK : Phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases  
PHF1 : PHD Finger Protein 1  
PLM : Promyelocytic Leukemia

*PNK* : polynucléotide kinase

PP1 : Protein Phosphatase 1

*PUMA* : P53 Up regulated Modulator of Apoptosis

RanBP2 : Ran Binding Protein2

RCPG : récepteur couplé aux protéine G

ROS : Reactive Oxygen Species

SDF1 : Stromal cell-Derived Factor 1

SENP : SENtrin/ SUMO specific Protease

SF2 : Superfamily II helicase-related proteins

SIM : SUMO-interacting Motif

SIRT1: Silent mating type information regulation 2 homolog 1

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

SWI/SNF : switching defective/sucrose nonfermenting

TGF $\beta$  : Transforming-Growth Factor-béta

*TLR2* : Toll Like Recepteur 2

TP53 : Tumor Protein p53

UV : Ultraviolet

WRN : Werner's syndrome protein

ZMYND8 : Zinc Finger MYND (myeloid, Nervy, and DEAF-1) domain Containing 8

## Index des figures

<b>Figure 1</b> : structure de la 8-Oxoguanine.....	<b>27</b>
<b>Figure 2</b> : a) Composition du domaine variable des TCRs et Immunoglobulines b) Représentation schématique de la diversité de recombinaison des gènes VDJ .....	<b>28</b>
<b>Figure 3</b> : Différentes étapes de la méiose .....	<b>29</b>
<b>Figure 4</b> : Initiation de la formation des DSBs par Spo11 .....	<b>29</b>
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique des principales kinases de la famille PIKK .....	<b>32</b>
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique des différentes étapes de la signalisation de la NHEJ .....	<b>34</b>
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique de la structure de la sous unité catalytique DNA-PKcs humaine.....	<b>35</b>
<b>Figure 8</b> : Les principaux sites de phosphorylation de la sous unité catalytique DNA-PKcs.....	<b>37</b>
<b>Figure 9</b> : Localisation des différents sites de phosphorylation de la protéine Artémis .....	<b>39</b>
<b>Figure 10</b> : Structure cristallographique schématisant l'interaction entre les protéines XRCC4 et DNA ligase IV .....	<b>40</b>
<b>Figure 11</b> : Structure cristallographique du complexe XRCC4/DNA ligase IV/XLF. A : Schématisation de l'interaction XRCC4/DNA ligase IV. B : Structure cristallographique de la protéine XLF. C : Représentation cristallographique du complexe XRCC4/DNA ligase IV/XLF .....	<b>41</b>
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique simplifiée des protéines impliquées dans la recombinaison homologue .....	<b>42</b>
<b>Figure 13</b> : Rôle de $\gamma$ H2AX dans la signalisation de la recombinaison homologue.....	<b>44</b>
<b>Figure 14</b> : Structure de la protéine Mre11. A : Représentation schématique des différents domaines de Mre11. B : Représentation d'un homodimère de Mre11 .....	<b>46</b>
<b>Figure 15</b> : Structure de la protéine Rad50. A : Représentation schématique des différents domaines de Rad50. B : Dimérisation de la protéine Rad50 via son domaine charnière dépendant du zinc.....	<b>48</b>
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique de la structure de la protéine NBS1 .....	<b>50</b>
<b>Figure 17</b> : Rôles de la phosphorylation de NBS1 par ATM au niveau des checkpoints du cycle cellulaire .....	<b>55</b>
<b>Figure 18</b> : Rôle de la phosphorylation de Rad50 par ATM au niveau des checkpoints du cycle cellulaire.....	<b>55</b>



<b>Figure 19</b> : Rôle de la phosphorylation de la protéine Mre11 par ATM.....	<b>56</b>
<b>Figure 20</b> : Représentation simplifiée de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/CDKs.....	<b>57</b>
<b>Figure 21</b> : Mécanisme d'action des complexes CDK/Cycline au cours du cycle cellulaire .	<b>58</b>
<b>Figure 22</b> : Principaux rôle de la kinase ATM dans la régulation des points de contrôle G1/S et G2/M .....	<b>60</b>
<b>Figure 23</b> : Représentation schématique des différents rôles de la protéine 53BP1 dans le choix de l'activation des mécanismes de réparation NHEJ et HR .....	<b>66</b>
<b>Figure 24</b> : Représentation schématique du recrutement des protéines 53BP1 et BRCA1 via les modifications post traductionnelles de l'histone H4.....	<b>71</b>
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique du recrutement et du rôle de la protéine ZMYND8 en présence de DSBs.....	<b>72</b>
<b>Figure 26</b> : Remodelage de la chromatine via la coopération de la protéine BRG1, la phosphorylation de l'histone H2AX et l'acétylation de l'histone H3 .....	<b>75</b>
<b>Figure 27</b> : Représentation schématique de la relaxation de la chromatine médiée par les protéines KAP1, HP1 et Tip60.....	<b>78</b>
<b>Figure 28</b> : Représentation schématique de la relaxation de la chromatine par l'intermédiaire de la dissociation de la protéine CHD3 et de KAP1.....	<b>80</b>
<b>Figure 29</b> : Association des dérégulations des protéines impliquées dans la NHEJ ou HR à de nombreux cancers.....	<b>83</b>
<b>Figure 30</b> : Représentation schématique de la structure du gène <i>HIC1</i> et des différents transcrits codants la protéine HIC1 .....	<b>91</b>
<b>Figure 31</b> : Modèle de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs <i>HIC1</i> et <i>TP53</i> .....	<b>95</b>
<b>Figure 32</b> : Représentation schématique du rôle des différentes régions de la protéine HIC1 permettant le recrutement de complexes ou protéines répressives.....	<b>96</b>
<b>Figure 33</b> : Régulation des MPTs de la Lysine 314 de la protéine HIC1.....	<b>98</b>
<b>Figure 34</b> : Boucle de régulation entre les protéines HIC1/ P53/SIRT1 ET P21 dans l'induction de l'apoptose.....	<b>104</b>
<b>Figure 35</b> : Boucle de régulation impliquant les protéines HIC1, SIRT1 et E2F1 en réponse aux DSBs.....	<b>105</b>
<b>Figure 36</b> : Détection de la phosphorylation de la protéine HIC1 au cours de la réparation des dommages à l'ADN dans les cellules HEK 293T.....	<b>180</b>
<b>Figure 37</b> : Détection de la phosphorylation de la protéine endogène HIC1 dans des fibroblastes BJ-hTert.....	<b>181</b>

<b>Figure 38</b> : Cinétique de phosphorylation endogène de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules BJ-hTert.....	<b>182</b>
<b>Figure 39</b> : La Sérine 694 est phosphorylée en réponse aux DSBs dans les cellules HEK 293T.....	<b>183</b>
<b>Figure 40</b> : Localisation des différents mutants de la protéine HIC1 par Immunofluorescence .....	<b>184</b>
<b>Figure 41</b> : Localisation de la protéine HIC1 phosphorylée sur la S694 dans des cellules U2OS.....	<b>185</b>
<b>Figure 42</b> : La phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 est importante pour la contribution de HIC1 dans la réparation des cassures double brin.....	<b>186</b>
<b>Figure 43</b> : La phosphorylation de la Sérine 694 est strictement dépendante de la kinase ATM.....	<b>187</b>
<b>Figure 44</b> : Cinétique de Phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN en présence ou non de l'inhibiteur de DNAPKcs (44A) ou de l'inhibiteur d'ATM (44B).....	<b>188</b>
<b>Figure 45</b> : Validation de l'implication de la kinase ATM dans la phosphorylation de la protéine HIC1 par immunofluorescence.....	<b>189</b>
<b>Figure 46</b> : Phosphorylation endogène de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables dans les fibroblastes humains BJ-hTert par la kinase ATM.....	<b>190</b>
<b>Figure 47</b> : Représentation schématique de la réparation des DSBs par NHEJ (A) ou par HR (B) induit par l'enzyme I-Sce1 .....	<b>191</b>
<b>Figure 48</b> : Absence d'effet de la surexpression de HIC1 (WT ou S694A) sur l'efficacité de réparation par HR et NHEJ .....	<b>192</b>
<b>Figure 49</b> : La protéine HIC1 ne semble pas réprimer de façon significative l'expression de l'enzyme I-Sce1.....	<b>192</b>
<b>Figure 50</b> : Etude de l'expression de HIC1 au niveau prostatique par des RT-qPCR et des analyses d'immunohistochimie .....	<b>194</b>
<b>Figure 51</b> : Origine des lignées cellulaires WPMY-1 et RPWE1 .....	<b>194</b>
<b>Figure 52</b> : Les cellules stromales prostatiques WPMY-1 expriment la protéine HIC1.....	<b>195</b>
<b>Figure 53</b> : La protéine HIC1 endogène dans les WPMY-1 est phosphorylée très rapidement en réponse aux DSBs.....	<b>196</b>
<b>Figure 54</b> : Localisation de la forme phosphorylée de la protéine endogène HIC1 suite à l'induction de DSBs dans les WPMY-1.....	<b>197</b>

<b>Figure 55</b> : Cinétique de phosphorylation endogène de la protéine HIC1 dans les cellules WPMY-1 au cours de l'induction de dommages réparables à l'ADN après un fractionnement cellulaire.....	<b>198</b>
<b>Figure 56</b> : Liste des gènes présents sur la plaque PCR arrays « Human DNA Damage Signaling Pathway » .....	<b>199</b>
<b>Figure 57</b> : Variabilité d'expression de différents gènes impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN entre les conditions siCtrl vs siHIC1 dans des cellules WPMY-1 traitées à l'Etoposide pendant 1H.....	<b>200</b>
<b>Figure 58</b> : Variabilité d'expression de différents gènes impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN entre les conditions siCtrl vs siHIC1 dans des cellules WPMY-1 traitées à l'Etoposide pendant 1H suivi d'une ré-incubation ou non en milieu normal pendant 4 h....	<b>201</b>
<b>Figure 59</b> : Niveau d'expression de p21 et de BBC3 suite à l'extinction du gène <i>HIC1</i> par ARN interférence dans les cellules WPMY-1.....	<b>202</b>
<b>Figure 60</b> : HIC1 réprime l'expression de p21 et de BBC3 en réponse aux dommages à l'ADN .....	<b>202</b>
<b>Figure 61</b> : Acétylation de la Lysine 623 en réponse aux DSBs .....	<b>205</b>
<b>Figure 62</b> : Cinétique d'acétylation de la Lysine 623 de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN.....	<b>206</b>
<b>Figure 63</b> : Représentation schématique d'essais comètes réalisés après surexpression de la protéine HIC1 WT et HIC1 K623R.....	<b>207</b>
<b>Figure 64</b> : Modifications post-traductionnelles de HIC1 en présence de dommages à l'ADN non-réparables. L'augmentation de SUMOylation de la Lysine 314 est strictement dépendante de la kinase ATM en réponse aux DSBs non réparables .....	<b>211</b>
<b>Figure 65</b> : Listes des gènes réprimés communs aux protéines HIC1 et MTA1.....	<b>212</b>
<b>Figure 66</b> : Rôle potentiel d'autres modifications post-traductionnelles (O-GlcNAcylation, Phosphorylation, Acétylation, ....) dans l'augmentation de fixation de la protéine HIC1 en réponse aux DSB non réparables au niveau du gène <i>SIRT1</i> .....	<b>213</b>
<b>Figure 67</b> : Sites de O-GlcNAcylation identifiés par le logiciel de prédiction « O-GlcNAcscan » .....	<b>214</b>
<b>Figure 68</b> : Modifications post-traductionnelles de HIC1 en réponse aux DSBs réparables. A/ la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 est strictement dépendante de la kinase ATM en réponse aux DSBs réparables et n'influe pas sur le niveau de la SUMOylation ; B/ la protéine HIC1 est acétylée en réponse aux DSBs par l'acétyl transférase Tip60 ...	<b>218</b>

<b>Figure 69</b> : La phosphorylation de la Sérine 694 permettrait le décrochage de la protéine HIC1 pour induire la relaxation de la chromatine afin de faciliter la réparation des DSBs au niveau de l'hétérochromatine.....	<b>220</b>
<b>Figure 70</b> : Représentation schématique des différentes fonctions de la protéine HIC1 en fonction de ces différents domaines.....	<b>223</b>
<b>Table 1</b> : Rôle des facteurs impliqués dans la voie classique de la recombinaison non homologue NHEJ .....	<b>30</b>
<b>Table 2</b> : Caractéristiques phénotypiques des différentes maladies touchant le complexe MRN et la protéine ATM .....	<b>53</b>
<b>Table 3</b> : Classification des principales enzymes responsables des modifications post-traductionnelles des protéines histones.....	<b>69</b>
<b>Table 4</b> : Simplification de la classification des différentes familles des remodeleurs de la chromatine impliquée dans la réponse des DSBs.....	<b>73</b>
<b>Table 5</b> : Liste des principaux inhibiteurs de la kinase ATM et leurs caractéristiques .....	<b>85</b>
<b>Table 6</b> : Différentes MPTs de HIC1 induites spécifiquement en réponse aux DSBs (Collaboration avec le Dr Adeline Page, IGBMC, Strasbourg).....	<b>178</b>
<b>Table 7</b> : Comparaison des extrémités C-terminales de HIC1 (programme CLUSTAL).....	<b>179</b>

# **INTRODUCTION**

L'intégrité du génome est constamment exposée à différents stress génotoxiques qui peuvent être délétères pour les cellules. Parmi ces stress on retrouve les dommages à l'ADN. Ceux-ci peuvent être causés par des erreurs lors de la réplication ou par des sources exogènes (UV, IR,) ou endogènes (les ROS : « Reactive Oxygen Species »). En cas de dommages à l'ADN, la cellule met en place un réseau complexe de voies de signalisation qui permettent la réponse aux dommages à l'ADN : la DDR (DNA Damage Response). Celle-ci implique la détection des dommages à l'ADN par l'activation des protéines « senseurs », le blocage du cycle cellulaire et l'activation des différentes voies de réparation ou l'activation de la voie apoptotique dans le cas de dommages non réparables.

## **I/ Les cassures simple et double brin de l'ADN**

### **1/Les cassures simple brin : origine de ces lésions**

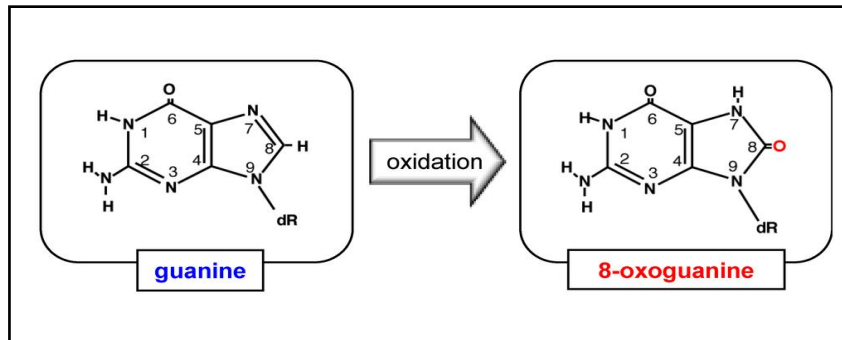
#### **1.1 Les sites abasiques**

Une cassure simple brin peut survenir suite à la formation de sites abasiques. Ceux-ci sont des lésions de l'ADN qui résultent de la rupture de la liaison glycosidique reliant la base (A, G, C ou T) et le désoxyribose. Le squelette désoxyribose-phosphate de l'ADN reste intact, mais la base est manquante.

Ce type de lésion peut survenir soit spontanément ou bien sous l'action d'une ADN glycosylase. Les sites abasiques engendrent des cassures simple brin qui seront réparées par la voie d'excision de base (BER). Ces lésions sont les plus fréquentes. En effet, elles sont estimées à plus de 10000 par jour et par cellule.

#### **1.2 Les bases oxydées**

Les formes réactives de l'oxygène ou « reactive oxygen species » (ROS) sont à l'origine de ces lésions. En effet, les ions superoxydes ( $O_2^-$ ) ou encore les radicaux hydroxyle (OH) issus du métabolisme mitochondrial peuvent former une multitude de lésions oxydatives dont la plus connue est la 8-oxoguanine (Figure 1). A l'heure actuelle, cette marque d'oxydation est considérée comme un très bon marqueur du stress oxydant. Il a été montré qu'une accumulation de la forme 8-oxoguanine au niveau de l'ADN peut entraîner la mort des cellules chez les mammifères (Nakabeppu, 2014).



**Figure 1 : structure de la 8-Oxoguanine**

Il existe d'autres sources endogènes à l'origine des cassures simple brin dont les mésappariements de bases ou encore les désaminations de bases. Cependant, celles-ci ne seront pas décrites dans ce manuscrit.

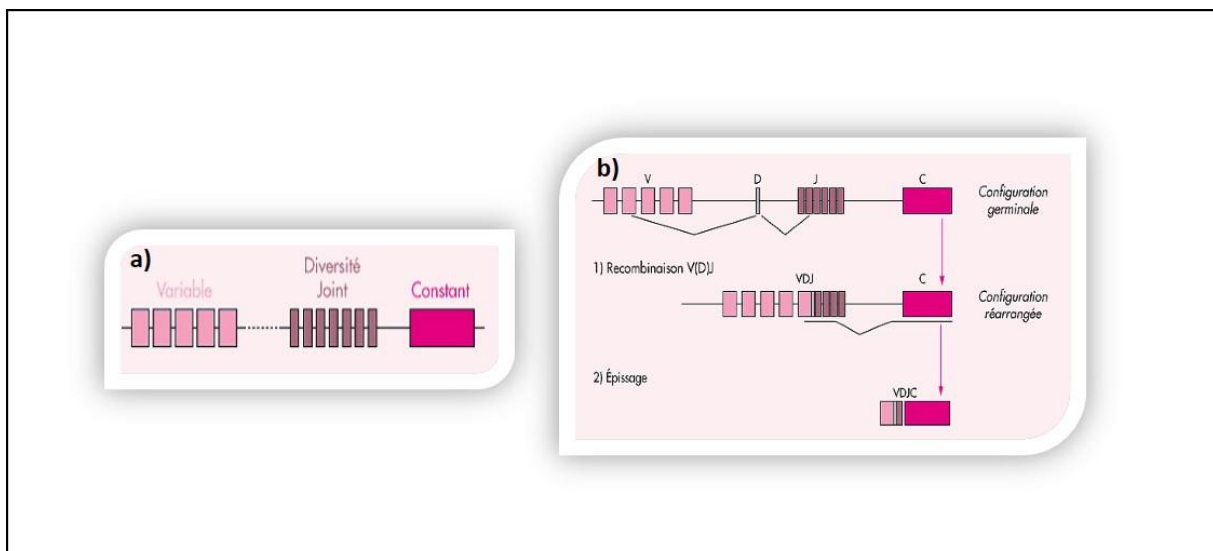
## **2/ Les cassures double brin (DSBs : DNA Double Strand Breaks)**

Les cassures double brin (DSBs) même si elles ne sont pas majoritaires, restent tout au moins les plus délétères pour la cellule. Cependant, il existe des situations qui seront détaillées plus loin dans lesquelles les DSBs sont essentielles pour le devenir cellulaire.

Les DSBs apparaissent suite à une exposition aux irradiations (IR) mais elles sont également induites par des agents génotoxiques, notamment des drogues utilisées pour des traitements anti cancéreux comme l'Etoposide ou le Cisplatine. Par exemple, l'Etoposide est un inhibiteur de la Topoisomérase II qui agit principalement lors de la réplication de l'ADN en empêchant la formation de super hélice par l'induction de cassures double brin. Celles-ci seront re-liguées ensuite par l'intervention d'une ligase. Ainsi en se fixant sur la Topoisomérase II, l'Etoposide va empêcher la ligase d'accéder aux dommages promouvant ainsi la persistance des cassures double brin de l'ADN menant à la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses.

## 2.1 Les cassures double brin programmées au cours du développement embryonnaire : la recombinaison des gènes VDJ

Le système immunitaire est composé entre autres de cellules B (lymphocytes B) et cellules T (lymphocytes T) qui par l'action de molécules spécifiques (Immunoglobulines pour les cellules B et récepteurs TCR pour les cellules T) situées au niveau de leur surface membranaire permettent de détecter la présence d'antigènes étrangers. Afin de pouvoir « détecter » le plus grand nombre d'antigènes possible, au cours de leur développement, ces cellules ont besoin de diversifier leurs récepteurs et immunoglobulines. Pour cela, le système de recombinaison VDJ a été mis en place. Il s'agit d'un mécanisme de réarrangement génique qui fait intervenir des protéines spécifiques dont RAG1 et RAG2 pour induire des cassures double brin. En effet les Immunoglobulines et les récepteurs TCR sont composés d'un domaine constant ancré à la membrane et d'un domaine variable composé lui-même de sous domaines nommés région variable (V), région de diversité (D) et région de jonction (J) (Figure 2a). Chacune de ces régions est codée par plusieurs gènes d'où la possibilité d'engendrer un grand nombre de combinaison différentes via les DSBs et ainsi de créer un répertoire de récepteurs TCR et d'Immunoglobulines conséquent (Figure 2b).

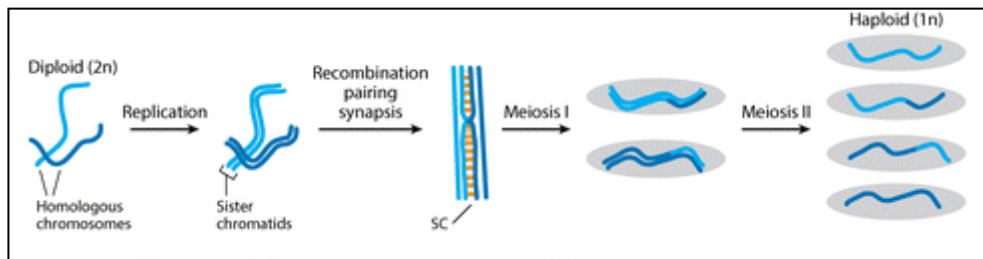


**Figure 2 :** a) Composition du domaine variable des TCRs et Immunoglobulines  
b) Représentation schématique de la diversité de recombinaison des gènes VDJ  
(D'après De villartay, 1999)



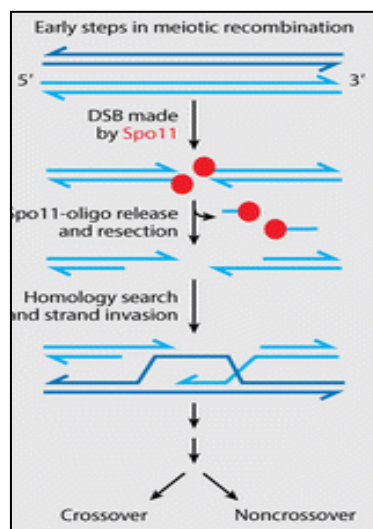
## 2.2 Les DSBs pendant la méiose

Pour commencer, une définition simple de la méiose. C'est une succession de 2 divisions permettant le passage d'une cellule mère diploïde ( $2n$ ) à la formation de quatre cellules filles ou gamètes haploïdes ( $n$ ) (Figure 3).



**Figure 3 : Différentes étapes de la méiose (D'après Keeney et al., 2014)**

Lors de la première division cellulaire, on peut observer des phénomènes de « crossing over » c'est-à-dire l'échange de fragments de chromatides entre deux chromosomes homologues pour permettre la diversité génétique. Ce phénomène est initié par la formation de cassures double brin et l'implication de la protéine Spo11 (Figure 4).



**Figure 4 : Initiation de la formation des DSBs par Spo11 (D'après Keeney et al., 2014)**

Les cassures double brin sont importantes pour le bon déroulement de la méiose mais peuvent être aussi dangereuses puisqu'elles peuvent engendrer des mutations délétères pour les cellules. C'est pourquoi la cellule met en place des programmes spécifiques qui contrôlent la formation des cassures double brin pendant la méiose (Pour revue Keeney et al., 2014).

### **3/ Les différentes sources à l'origine des cassures double brin de l'ADN**

#### **3.1 Les sources endogènes**

Une étude réalisée en 2003 a montré que dans une cellule normale, 1% des cassures simple brin sont converties en DSBs, c'est à dire environ 50 DSBs par cellule et par cycle cellulaire (Vilenchik et Knudson, 2003).

Les ROS peuvent également être à l'origine des cassures double brin. En effet une cassure simple brin non réparée induite par les ROS peut se transformer en cassure double brin.

#### **3.2 Les sources exogènes des DSBs, radiothérapie et chimiothérapie**

Pour lutter contre le cancer et notamment pour le traitement des tumeurs solides, la radiothérapie et/ou la chimiothérapie sont préconisées. En effet, les radiations ionisantes sont utilisées afin d'induire des lésions au niveau de l'ADN. Cependant, les cassures double brin sont les dommages radio-induits les plus rares puisque l'on retrouve près de 1 000 cassures simple brin contre 40 cassures double-brin par gray (unité de radiation) (Khalifa et al., 2012).

Des drogues anti cancéreuses sont également utilisées pour lutter contre le cancer. Il s'agit d'agents inhibiteurs de la topoisomérase II comme l'Etoposide ou encore d'agents radiomimétiques comme la Bléomycine (Chen et Stubbe, 2005).

Pour pouvoir contrôler le niveau de dommages à l'ADN, les cellules ont mis en œuvre un réseau complexe de voies de signalisation impliquées dans la détection des dommages et dans le contrôle du cycle cellulaire appelé réponse aux dommages de l'ADN (DDR) qui aboutit soit à la réparation du dommage soit à la mort cellulaire programmée dans le cas de dommages non réparables.

En effet, en réponse aux cassures double brin, deux mécanismes majeurs de réparations sont activés. Il s'agit soit de la recombinaison non homologue par ligation des extrémités, NHEJ ou de la recombinaison homologue, HR.

## **II/ Les principales voies de réparations des cassures double brin de l'ADN**

### **1/ La recombinaison non homologue par ligation des extrémités ou non homologous end joining (NHEJ)**

Ce mécanisme de réparation est rapide mais infidèle et consiste à re-liguer les extrémités engendrées lors des cassures double brin. Ce mécanisme engendre une perte d'une dizaine de paires de bases. Il est opérationnel dans toutes les phases du cycle cellulaire puisqu'il n'a pas besoin du brin complémentaire pour réparer la cassure. Chez l'homme et chez les organismes eucaryote supérieurs, ce mécanisme est le plus utilisé par les cellules pour réparer les DSBs. Il existe plusieurs voies de réparation NHEJ. La voie classique c-NHEJ (classical-NHEJ) fait intervenir un complexe protéique composé, entre autres, de la sous unité catalytique de la kinase DNA-PKcs, et des protéines Ku70 et Ku80 mais également de la ligase 4 et d'autres facteurs (Table 1).

Category	Protein c-NHEJ	Description
DNA-PK	Ku70	+ DSB recognition
	Ku80	+ Ku70 partner protein
	DNA-PKcs	+ DSB-dependent protein kinase
Ligase	Lig4	+ Ligase catalytic subunit
	XRCC4	+ Lig4 structural scaffold
	XLF	+ Lig4 structural scaffold
MRN	Mre11	+ Dimerization, nuclease
	Rad50	+ Regulatory ATPase

***Table 1 : Rôle des facteurs impliqués dans la voie classique de la recombinaison non homologue NHEJ (d'après Chiruvella et al., 2013).***

Lorsque la voie classique est défaillante, les cellules mettent en place une voie alternative (alt-NHEJ ou A-NHEJ) faisant intervenir entre autres les protéines PARP1

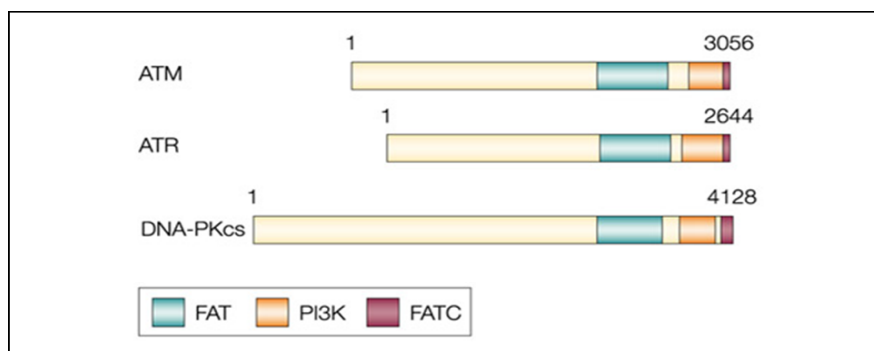
et XRCC1. Cette voie ne sera pas détaillée dans ce manuscrit (Pour revue voir Frit et al., 2014).

## 1.1 La signalisation de la voie classique c-NHEJ

### 1.1.1 La complexe multi protéique DNA-PK : l'historique

Le complexe DNA-PK a été découvert dans des extraits de cellules Hela. En effet, Carter en 1988 et Jackson en 1990 ont montré qu'une kinase dépendant de l'ADN était capable de phosphoryler l'antigène T du virus SV40, le facteur de transcription Sp1 et une multitude de protéines de liaison à l'ADN. Ces deux scientifiques ont conclu en 1990 qu'il s'agissait de la même protéine kinase et lui ont donné le nom de DNA-PK.

DNA-PK est une sérine/thréonine kinase de 470 kKDa. Elle appartient à la famille des phosphatidylinositol-3-kinase like kinases (PI3KK) (Hadley et al., 1995 ; Poltoratsky et al., 1995). La famille PIKK regroupe 6 membres dont les kinases ATM, ATR et DNA-PK. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique au niveau C-terminal possédant une forte homologie de séquence avec celui de la famille des kinases PI3K, encadré par un domaine FAT situé en N-terminal et un domaine FATC en C-terminal (Figure 5).



**Figure 5 : Représentation schématique des principales kinases de la famille PIKK (d'après Shiloh, 2003).**

DNA-PK est un complexe multi-protéique composé de la sous unité catalytique DNA-PKcs et la protéine régulatrice Ku. La protéine Ku est elle-même un hétérodimère de 2 protéines Ku70 et Ku80, de 70 et 80 KDa respectivement. La protéine Ku a été découverte dans les années 1980 comme étant un auto-antigène dans le sérum de

patients diagnostiqués avec une maladie auto-immune : le syndrome de sclérodermie (durcissement de la peau) avec polymyosite (dégénérescence des fibres musculaires) (Mimori et al., 1981). Quelques années plus tard, la protéine Ku a été caractérisée comme étant principalement une protéine nucléaire avec des propriétés de fixation au niveau de l'ADN et plus spécifiquement au niveau des extrémités des cassures double brin de l'ADN (Mimori et al., 1986).

### 1.1.2 Mécanisme cellulaire de la voie NHEJ classique

La première étape est la reconnaissance rapide des extrémités de la cassure par les protéines Ku70 et Ku80 suivie de leur fixation avec une très forte affinité pour protéger les extrémités libres issues des cassures double brin. En effet, il a été montré que l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe sur l'ADN après seulement 5 secondes (Mari et al., 2006). La fixation est indépendante de la séquence d'ADN.

Les sous unités Ku70 et Ku80 possèdent 3 domaines :

- une région N-terminale,
- un domaine central responsable de la fixation au niveau de l'ADN et de la dimérisation,
- une extrémité C-terminale très divergente entre les deux protéines.

En effet, la taille de l'extrémité C-Terminale de Ku80 est de 15KDa alors que celle de Ku70 est de 5KDa. Chez les vertébrés, la région C-Terminale de Ku80 est impliquée dans le recrutement de la sous unité catalytique de la kinase DNA-PK (Singleton et al., 1999) alors que celle de Ku70 possède des propriétés importantes pour la fixation à l'ADN.

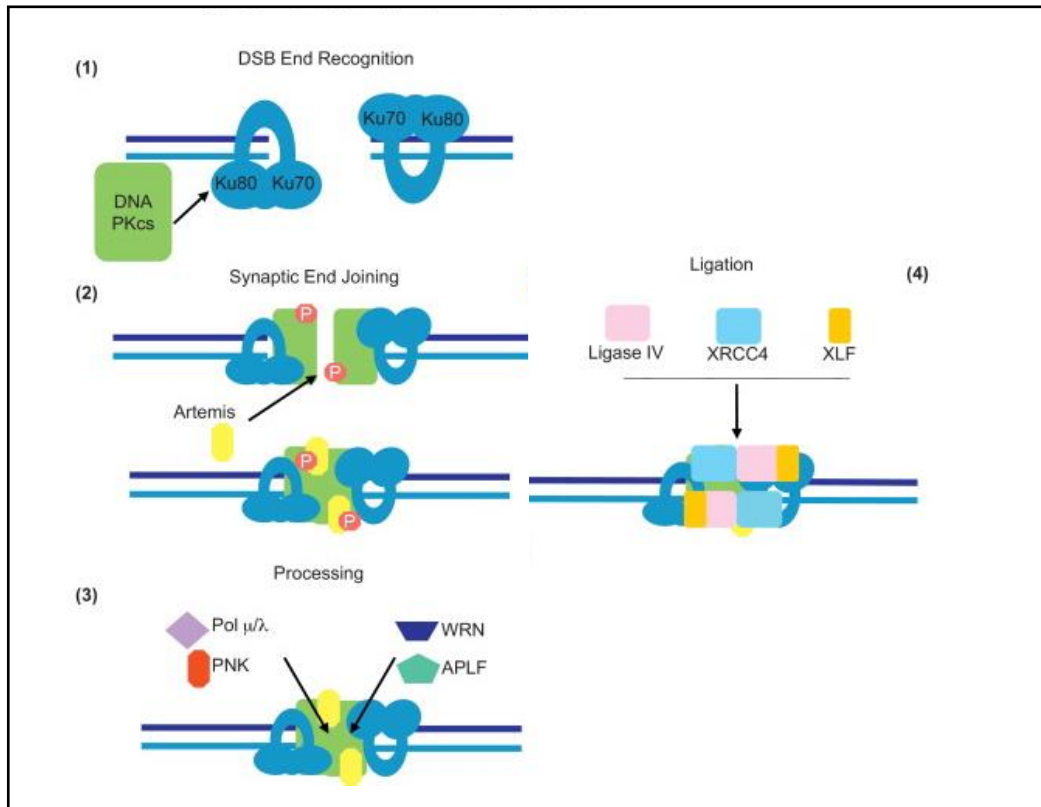
De plus, la structure cristallographique de Ku70/Ku80 montre que les deux sous unités se dimérisent par le domaine central pour former un anneau autour de l'ADN en présence de DSBs (Walker et al., 2001). De plus, une autre étude (Wu et Lieber, 1996) a montré l'importance de la région C-terminale des deux protéines pour leur interaction.

Actuellement, il n'y a aucune étude qui démontre réellement l'existence des formes monomériques des sous unités Ku. Les données de la littérature indiquent que les protéines Ku70 et Ku80 seules n'ont pas la capacité de se lier à l'ADN (Wu et Lieber, 1996), que les souris déficientes pour la protéine Ku70 présentent un faible niveau d'expression de la protéine Ku80, et inversement, que les souris déficientes pour la protéine Ku80 présentent un faible niveau d'expression de la protéine Ku70 (Gu et al.,

1997; Singleton et al., 1997). Ceci suggère fortement que chaque sous unité est requise pour la stabilité et la fonctionnalité du complexe Ku.

La formation du complexe Ku70/Ku80 est donc indispensable et nécessaire à la fixation au niveau de l'ADN et l'hétéro-dimérisation est indispensable pour la réparation des DSBs par NHEJ (Gu et al., 1997). Ainsi, la protéine DNA-PK joue un rôle important dans le maintien des extrémités de l'ADN au niveau des DSBs.

Suite à la reconnaissance et à la stabilisation des cassures double brin par le dimère Ku70-Ku80 (Figure 6.1), la protéine Ku80 va recruter la sous unité catalytique DNA-PKcs (Figure 6.2) permettant ainsi l'activation de la fonction kinase du complexe DNA-PK. Puis, par le biais de modifications post traductionnelles telle que la phosphorylation (Figure 6.3), un dialogue inter protéines s'établit pour permettre la réparation des dommages percus par la cellule (Lopez-Contreras et Fernandez-Capetillo, 2012). Ainsi, la protéine DNA-PK joue le rôle de plateforme permettant de recruter d'autres facteurs protéiques importants pour la voie classique NHEJ tels que Artemis, XRCC4, XLF et la ligase IV (Figure 6.3).

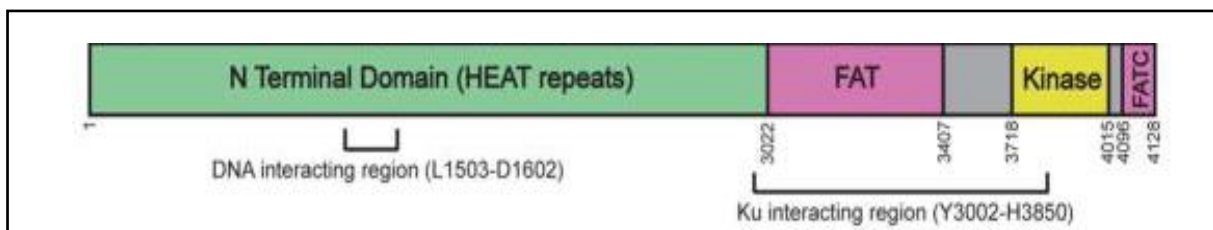


**Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de la signalisation de la NHEJ (d'après Fell et Schild-Poulter, 2015)**

## 1.2 Rôle de la sous unité catalytique DNA-PKcs dans le processus de réparation NHEJ

### 1.2.1 Structure de la sous unité catalytique, DNA-PKcs

DNA-PKcs a une séquence protéique de 4129 acides aminés (Hill et Lee, 2010). Cette protéine est structurée par une très grande région N-terminale composée de 66 répétitions HEAT( **H**untingt**I**n-**E**longation **A** subunit-**T**or) (Sibanda et al., 2010). Celles-ci sont importantes pour les interactions protéine-protéine. Le domaine N-terminal est aussi impliqué dans l'interaction avec l'ADN. Cette protéine est également structurée par une région C-terminale composée d'un domaine FAT (FRAP, ATM et TRAPP) de 400 acides aminés nommé ainsi du fait de la forte homologie entre ces différentes protéines impliquées dans l'interaction avec la protéine Ku, d'un domaine PI3K et enfin d'un domaine FATC (FAT C-terminal) (Hill et Lee, 2010 ; Jette et Lees-Miller, 2015) (Figure 7).



**Figure 7 :** Représentation schématique de la structure de la sous unité catalytique DNA-PKcs humaine

### 1.2.2 Modifications post-traductionnelles de DNA-PKcs : les sites d'autophosphorylation

Les premiers travaux portant sur l'étude des modifications post traductionnelles telles que les autophosphorylations de la protéine DNA-PK *in vitro*, ont démontré que celles-ci induisaient son inactivation par la dissociation de la sous unité catalytique DNA-PKcs de la protéine Ku au niveau des extrémités des cassures double brin de l'ADN (Chan et Lees-Miller, 1996; Merkle et al., 2002). Cependant, des études plus approfondies sur les sites d'autophosphorylation de la sous unité catalytique DNA-PKcs ont été conduites afin de comprendre comment ces phosphorylations régulent la réparation des dommages.

Ces études ont permis de découvrir deux « clusters » majeurs d'autophosphorylation très conservés de DNA-PKcs. Initialement, au niveau de la région N-terminale, un « cluster » nommé ABCDE constitué de 6 sites d'autophosphorylation et situé entre les résidus 2609 et 2647 (Figure 8) a été découvert. En effet, l'étude de Ding et al., en 2003, a montré *in vitro* dans des cellules exprimant une forme mutée de la sous unité DNA-PKcs (et plus précisément ne possédant pas le cluster ABCDE) que celles-ci avaient une sensibilité augmentée aux radiations ionisantes et un grave défaut au niveau du mécanisme de recombinaison des gènes VDJ.

De plus, des essais fonctionnels ont montré au niveau de ce cluster qu'un seul site phosphorylé parmi les 6, quel qu'il soit, était suffisant à la fonctionnalité de la sous unité catalytique DNA-PKcs et que si l'on substituait individuellement ces 6 sites par des Alanine pour empêcher la phosphorylation, cela n'affecterait pas la fonctionnalité de celle-ci. Par contre, le mécanisme de réparation des dommages était bloqué au niveau de l'étape « end processing » (Figure 6 .3) (Block et al., 2004).

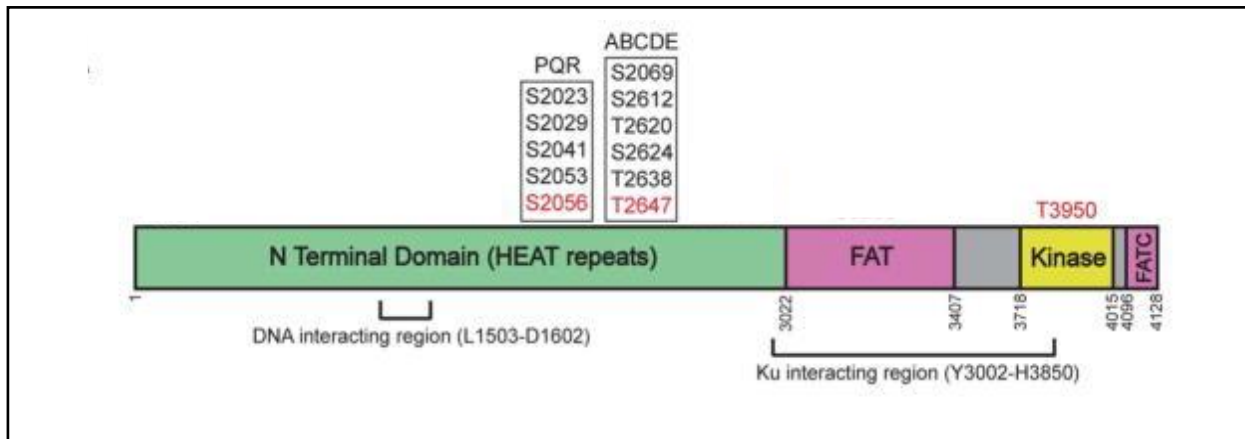
Plus tard, un nouveau cluster fut découvert et fut nommé PQR. Ce cluster est constitué de 5 sites d'autophosphorylation situés entre les résidus 2023 et 2056 (Cui et al., 2005) (Figure 8). La phosphorylation de la Sérine 2056 a été identifiée *in vitro* par Cui et al. en 2005 et *in vivo* par Chen et al. la même année. Pour de nombreux chercheurs, la phosphorylation de cette Sérine est considérée comme une marque activatrice par autophosphorylation de la sous unité catalytique DNA-PKcs contrairement aux phosphorylations des résidus T2609 et T2647. En effet, ces phosphorylations existent toujours même lorsque le domaine kinase est non fonctionnel (Uematsu et al., 2007).

Des études ont montré l'existence d'un dialogue entre ces deux clusters. En effet, le cluster d'autophosphorylation PQR inhibait l'étape de « end processing » alors que le cluster ABCDE la promouvait (Cui et al., 2005). Ceci implique donc une régulation fine de ces phosphorylations lors de cette étape de réparation.

En 2007, un autre site de phosphorylation appelé T fut découvert (Douglas et al., 2007). Il s'agit de la Thréonine 3950 située au niveau du domaine PI3K et est très important pour la fonctionnalité de l'activité kinase de la DNA-PK. En effet, cette équipe a montré que lorsque l'on mute la Thréonine en acide Aspartique, cela impactait négativement sur la recombinaison des gènes VDJ et augmentait également la sensibilité aux radiations.



Au cours de la même année, Meek et al., montrent que ces deux clusters ABCDE et PQR étaient impliqués dans l'étape de « end processing » mais pas dans celle de « end joining ». Cette étude est donc la preuve qu'il existe d'autres sites de phosphorylation au niveau de la sous unité catalytique DNA-PKcs pour permettre la finalisation de la réparation par NHEJ.



**Figure 8** : Les principaux sites de phosphorylation de la sous unité catalytique DNA-PKcs (d'après Jette et Lees-Miller, 2014.)

Après l'étape d'activation de la DNA-PKcs, un remodelage obligatoire des extrémités des deux brins issus de la cassure (appelé également étape de maturation) est alors effectué afin de permettre l'étape finale de ligation. Pour cela, DNA-PKcs va recruter d'autres facteurs protéiques. En effet, l'étape de maturation va permettre de « nettoyer » les extrémités 5'OH et 3' phosphate libres, et d'enlever les bases endommagées. Cette étape fait intervenir la polynucléotide kinase PNK. Celle-ci possède une double fonctionnalité qui lui permet d'assurer la maturation des extrémités, d'une part via son activité 5' kinase pour générer des extrémités 5'P et d'autre part via son activité 3' phosphatase pour générer des extrémités 3'OH. Ensuite, des polymérases ( $\mu$  et  $\lambda$ ) seront recrutées pour permettre la resynthèse d'ADN assurant ainsi l'étape finale : la ligation, faisant intervenir la protéine Artémis et le complexe XRCC4/ADN ligase IV/ XLF (Figure 6).

### 1.3 Rôle des protéines Artémis, XLF et du complexe DNA ligase IV et XRCC4 dans l'étape de ligation de la NHEJ

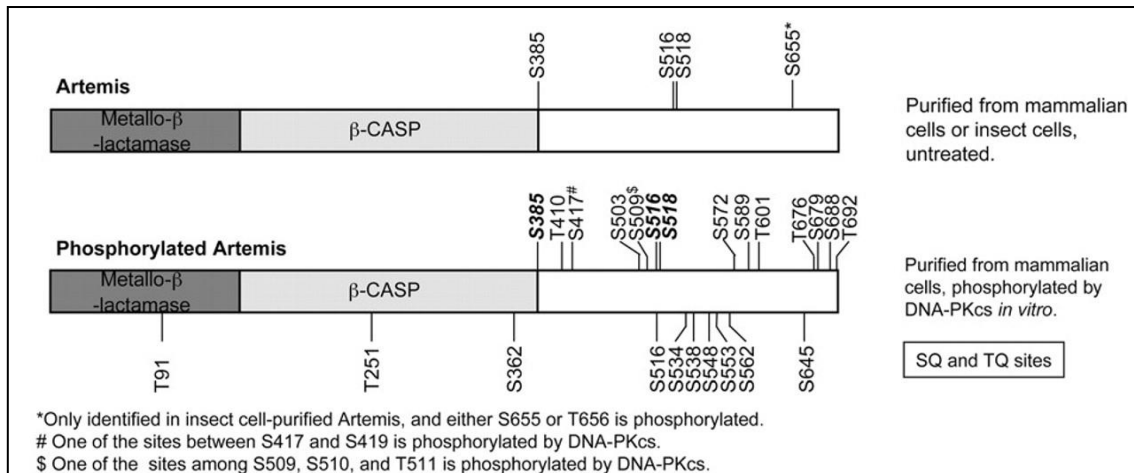
#### 1.3.1 La protéine Artémis dans le contexte des dommages à l'ADN

La protéine Artémis fait partie de la superfamille des métallo- $\beta$ -lactamases. Elle hydrolyse la liaison phospho-diester au niveau de l'ADN. C'est une endonucléase avec une activité exonucléolytique polarisée de 5' vers 3'. Ainsi, Artémis joue un rôle dans la maturation des extrémités des deux brins d'ADN issus des DSBs.

Il a été montré que cette protéine s'associe avec la sous unité catalytique DNA-PKcs pour former un complexe stable *in vitro* indépendamment de la présence d'ADN (Ma et al., 2005). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que ce complexe agissait comme une endonucléase qui élimine les structures en forme d'épingle à cheveux observées dans le processus de recombinaison des gènes VDJ.

Plus tard, la même équipe a montré *in vitro* mais également *in vivo* que la protéine Artémis interagissait avec DNA-PKcs via son domaine C-terminal (Ma et al., 2005). De plus, la sous unité catalytique DNA-PKcs phosphoryle la protéine Artémis au niveau C-terminal sur plusieurs sites (Figure 9) induisant un changement de conformation, permettant ainsi son activation.

Récemment, il a été montré que la protéine Artémis interagissait via son domaine C-terminal avec d'autres acteurs importants pour la réparation des cassures double brin par NHEJ. Il s'agit du complexe protéique XRCC4/DNA Ligase IV. Cette interaction est indépendante de l'ADN et de la sous unité catalytique DNA-PKcs. Des mutations ponctuelles au niveau de la région C-terminale de la protéine Artémis se traduisent par des altérations d'interactions avec ce complexe multi protéique et d'autres protéines générant ainsi une forte diminution de la recombinaison des gènes VDJ du fait des perturbations de réparations des cassures double brin (Malu et al., 2012).



**Figure 9 : Localisation des différents sites de phosphorylation de la protéine Artémis (d'après Ma et al., 2005)**

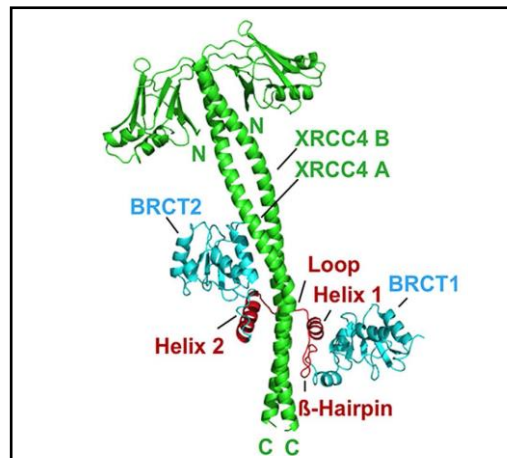
### 1.3.2 L'étape de ligation médiée par le complexe XRCC4/DNA ligase IV et XLF

La protéine DNA ligase IV est spécifique à la réparation des cassures double brin par NHEJ. Elle est composée d'un domaine catalytique au niveau de la région N-terminale et de deux domaines BRCT (BRCA1 (Breast Cancer Associated) C-Terminal domain) au niveau de la région C-terminale. Entre les deux régions N et C-terminale, il existe un linker flexible (Ochi et al., 2013). Elle catalyse une réaction de transfert d'un groupement phosphate provenant d'une molécule d'ATP pour permettre la ligation finale des deux brins d'ADN.

La protéine XRCC4 est un partenaire physique de la DNA ligase IV. Elle ne possède pas d'activité enzymatique, sa séquence polypeptidique est composée de 336 acides aminés. Au niveau de sa structure, XRCC4 possède une tête globulaire au niveau N-terminal et une queue en forme d'hélice responsable de sa dimérisation et de l'interaction avec la DNA ligase IV. En effet, la protéine XRCC4 pour qu'elle soit active doit se complexer avec la DNA ligase IV (Sibanda et al., 2001). Des études structurales et fonctionnelles ont montré que la DNA ligase IV interagissait avec la protéine XRCC4 par la région comprenant le linker flexible entre les deux domaines BRCT (Figure 10).

La DNA ligase IV est physiquement nécessaire et indispensable au recrutement et à la stabilité de la protéine XRCC4. Une étude a montré dans des cellules XR1 déficientes pour la protéine XRCC4 que la DNA ligase IV seule est instable puisqu'il était impossible de la détecter par Western Blot (Bryans et al., 1999). Par contre, la ré-

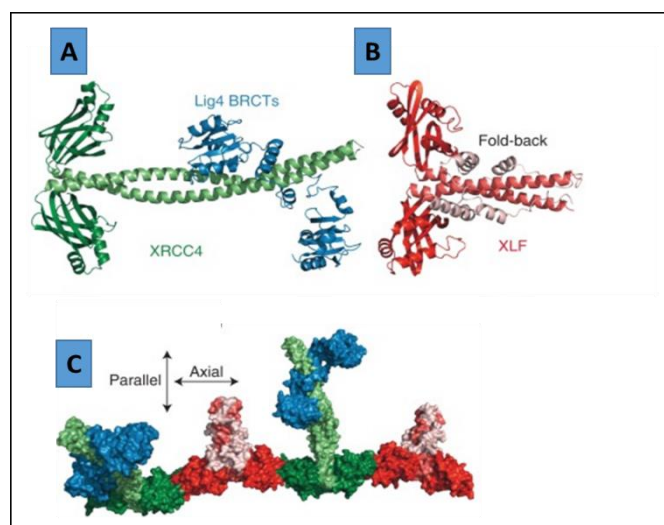
introduction de la protéine XRCC4 dans cette même lignée cellulaire réinstaurait la détection de la DNA ligase IV.



**Figure 10 :** Structure cristallographique schématisant l'interaction entre les protéines XRCC4 et DNA ligase IV (d'après Menchon et al., 2016)

Le complexe XRCC4/DNA ligase IV est responsable de la fermeture de la cassure des deux brins de l'ADN (Grawunder et al., 1998). Ce complexe interagit également avec une autre protéine, il s'agit de XLF. Celle-ci partage une architecture homodimérique similaire à la protéine XRCC4 et plus précisément elle possède une tête globulaire et une queue hélicoïdale. Contrairement à XRCC4, XLF n'est pas requise pour la stabilité de la DNA ligase IV (Lu et al., 2007). Le complexe XRCC4/DNA ligase IV interagit avec XLF via leurs têtes globulaires (Figure 11). Cependant ce complexe tri-protéique est beaucoup moins stable que le complexe XRCC4/DNA ligase IV seul (Riballo et al., 2009). Comme la protéine XRCC4, la protéine XLF ne possède pas d'activité enzymatique mais stimule l'activité de la DNA ligase IV.

Dans cette dernière étape, il faut également mentionner l'importance de la sous unité catalytique DNA-PKcs. En effet, celle-ci phosphoryle la protéine Artémis comme mentionné précédemment mais également les protéines XRCC4 (Calsou et al., 2003) et la protéine XLF (Wu et al., 2007) permettant ainsi la stimulation de la ligation de la cassure.



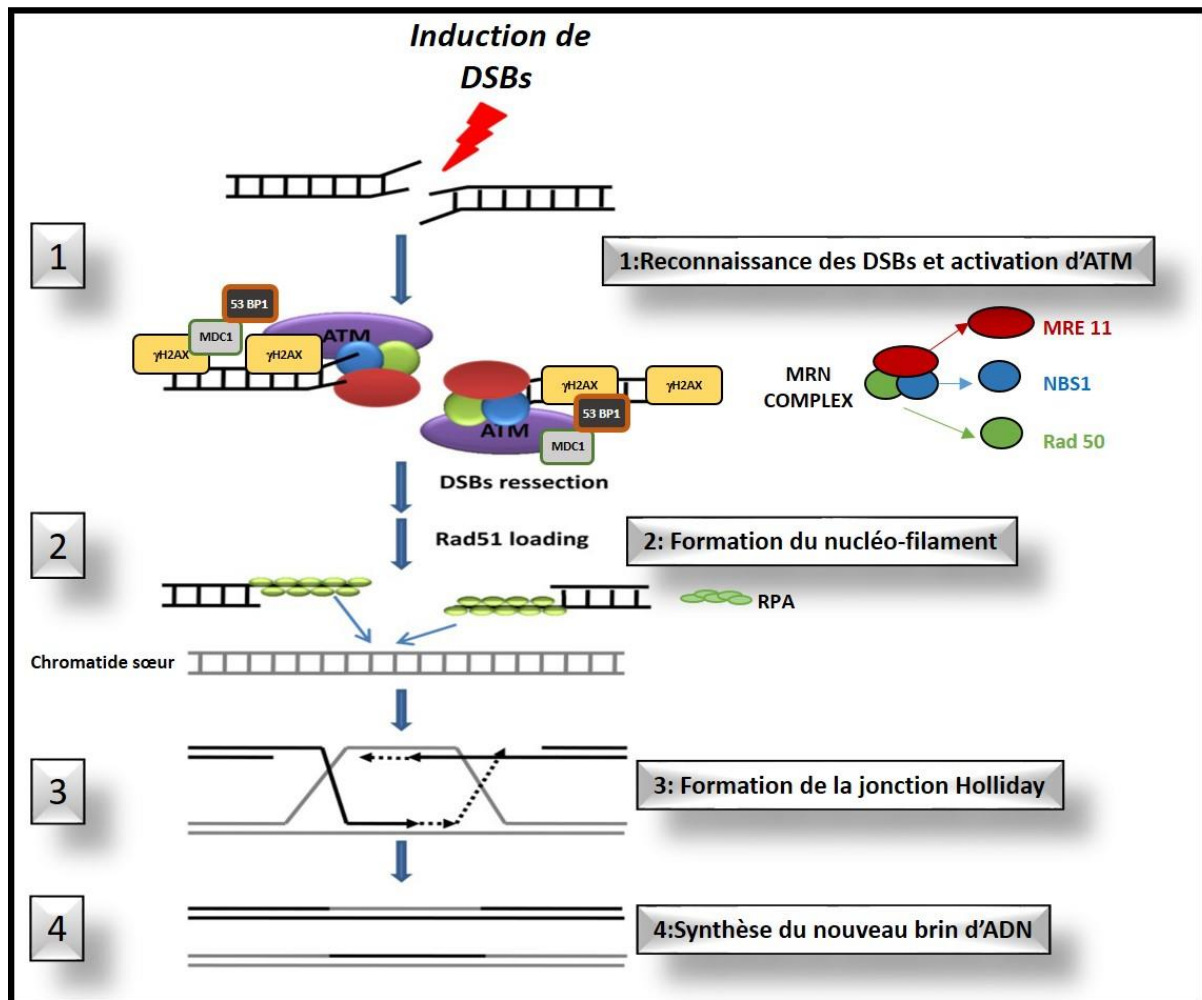
**Figure 11** : Structure cristallographique du complexe XRCC4/DNA ligase IV/XLF. A : Schématisation de l'interaction XRCC4/DNA ligase IV. B : Structure cristallographique de la protéine XLF. C : Représentation cristallographique du complexe XRCC4/DNA ligase IV/XLF (d'après Chiruvella et al., 2013)

## 2/ La recombinaison homologue ou HR

Contrairement au mécanisme de réparation par NHEJ, la recombinaison homologue est un mécanisme très lent mais fidèle puisqu'il contribue à la réparation de la cassure sans aucune perte d'information génétique. Ce processus de réparation est impliqué dans la suppression de l'instabilité génomique pendant la réplication de l'ADN. Pour pouvoir permettre cela, ce processus requière la présence de la chromatide sœur qui sera utilisée comme matrice. Du fait de cette contrainte physique, la recombinaison homologue est seulement possible en phase S tardive et G2 du cycle cellulaire. La présence de la chromatide sœur est vraiment cruciale puisqu'une étude a montré que si la recombinaison homologue avait lieu en phase G1 du cycle cellulaire cela aboutirait à la formation d'une translocation chromosomique et à une perte d'hétérozygotie (LOH) (Richardson et Jasin, 2000).

Ce mécanisme de réparation est très complexe du fait de la multitude de protéines impliquées. En effet, la HR nécessite l'implication d'une myriade de facteurs protéiques tels que la protéine kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), le complexe MRN, les protéines 53BP1, MDC1, RNF8 et RPA et de nombreuses autres (Figure 12). Ces protéines sont réparties dans 3 classes différentes, à savoir les protéines senseurs telles que ATM, les protéines médiatrices telles que MDC1 et pour finir les protéines

effectrices telles que la kinase Chk2. Cependant l'implication et l'activation de la protéine kinase ATM est véritablement indispensable dans ce mécanisme de réparation puisque c'est l'évènement clé de la réponse aux cassures double brin de l'ADN.



**Figure 12** : Représentation schématique simplifiée des protéines impliquées dans la recombinaison homologue (adaptée à partir de Lopez-Contreras et Fernandez-Capetillo 2012)

Brièvement, on peut considérer que le mécanisme de la réparation homologue s'effectue en 4 étapes (Figure 12) : il s'agit premièrement, de la reconnaissance des DSBs par le complexe MRN et l'activation de la protéine kinase ATM. Deuxièmement, une étape de résection permet l'élaboration d'un ADN simple brin. Celle-ci est mise en place par l'intermédiaire d'enzymes de restriction telles que Exo1, Mre11 (Paull et Gellert, 1998) et CtIP (Sartori et al., 2007 ; You et al., 2009 ; Makharashvili et al., 2014). Suite à cela, s'en suit l'étape de création d'un nucléo-filament initiée par les protéines

BRCA1, Rad51 et RPA. En effet, les protéines Rad51 et BRCA1 vont permettre la fixation des protéines RPA au niveau de l'ADN simple brin avec l'aide d'autres protéines pour initier l'invasion au niveau du brin complémentaire (Baumann et al., 1996). En ce qui concerne le nucléo-filament, une étude a montré la création de celui in vitro (Forget, 2012).

Et pour terminer, la 4<sup>ème</sup> étape permettant la synthèse du nouveau brin d'ADN requiert la présence et l'activation de plusieurs protéines hélicases incluant BLM (Bloom Syndrome protein), WRN (Werner's syndrome protein) et bien d'autres.

## 2.1 Etape initiale de la recombinaison homologue : reconnaissance des cassures double brin et formation des foyers « DNA Damage Response » (DDR)

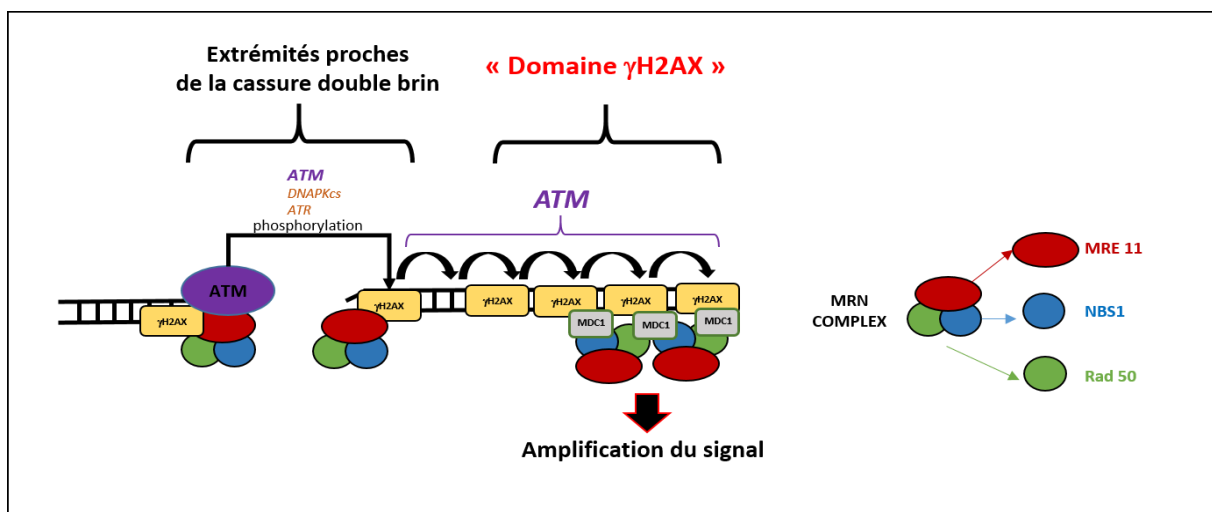
### 2.1.1 Formation de la marque $\gamma$ H2AX

En réponse aux cassures double brin, l'évènement clé de la DDR est l'activation de la kinase ATM. Pour initier la signalisation de la recombinaison homologue, celle-ci va phosphoryler un variant de l'histone H2A, H2AX au niveau de la Sérine 139 qui est alors appelée  $\gamma$ H2AX (Rogakou et al., 1997). Une accumulation importante et très rapide de cette marque est observée en réponse aux radiations ionisantes. En effet, après 1 minute d'irradiation, des analyses par immunofluorescence ont montré la formation de foyers  $\gamma$ H2AX dans des cellules de mammifères mais également dans des cellules de Xénope et de Drosophile (Rogakou et al., 1999). Il a également été montré l'implication de la kinase DNA-PKcs dans la phosphorylation de l'histone H2A en réponse aux radiations ionisantes (Stiff et al., 2004) mais également l'implication de la kinase ATR dans le cas de cassures simple brin. En effet, dans des conditions de stress répliatif, l'inhibition de la réplication de l'ADN par de l'hydroxy-urée ou l'utilisation de radiations UV induisent la phosphorylation de la Sérine 139 de l'histone H2AX de manière dépendante de la kinase ATR et ne requièrent pas l'implication de la kinase ATM (Ward et Chen, 2001).

Suite à la phosphorylation de l'histone H2AX, la marque  $\gamma$ H2AX va s'étendre sur une distance de plusieurs dizaines de mégabases depuis les DSBs ce qui aura pour conséquence l'amplification du signal permettant ainsi le recrutement des protéines de réparation telle que MDC1 (Figure13). On parle ici de formation de « domaine  $\gamma$ H2AX ». Cette marque va dans un premier temps permettre le remodelage de la chromatine pour faciliter dans un second temps l'accès aux protéines de réparation.

Ainsi,  $\gamma$ H2AX est considérée comme une plateforme de recrutement. Au niveau des « domaine  $\gamma$ H2AX », la protéine MDC1 se fixe directement au niveau de  $\gamma$ H2AX via des répétitions BRCT au niveau de son domaine C-terminal (Stucki et al., 2005). A son tour, MDC1 recrute le complexe MRN via la protéine NBS1 stabilisant ainsi le complexe MRN et pour finir celui-ci recrutera et activera la kinase ATM. Ainsi, au niveau des domaines  $\gamma$ H2AX, la protéine MDC1 joue le rôle de médiateur pour amplifier la réponse aux dommages à l'ADN via la protéine kinase ATM. Une étude de 2013 a montré que seule la protéine kinase ATM est responsable de l'extension de la marque  $\gamma$ H2AX et de la formation du « domaine  $\gamma$ H2AX » puisque son abolition conduit à une réduction importante de l'amplification du signal. Par contre, dans cette même étude, les auteurs ont montré au niveau des extrémités proches des DSBs l'implication de la sous unité catalytique DNA-PKcs dans l'établissement de la marque  $\gamma$ H2AX puisque la perte de la protéine ATM n'abolit pas totalement la formation de foyers  $\gamma$ H2AX (Rass et al., 2013).

Aujourd'hui, la phosphorylation de la Sérine 139 de l'histone H2AX est considérée comme un bon marqueur de dommages à l'ADN, cependant elle doit être complétée avec l'existence d'autres marqueurs puisqu'une étude a montré que l'on pouvait détecter cette marque de phosphorylation en absence de dommages à l'ADN. En effet, en 2005, les auteurs ont détecté dans des cellules Hela la présence de la forme phosphorylée de l'histone H2AX  $\gamma$ H2AX en phase M du cycle cellulaire et ceci en absence de dommages à l'ADN (Ichijima et al., 2005).



**Figure 13 : Rôle de  $\gamma$ H2AX dans la signalisation de la recombinaison homologue**



### 2.1.2 Le complexe MRN

La première étape de la recombinaison homologue est la reconnaissance des extrémités libres issues des cassures double brin par un complexe hétéromérique Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) (De Jager et al., 2001). NBS1 permet d'une part, le recrutement de la kinase ATM au niveau des sites endommagés et d'autre part son activation. Suite à cette interaction, ATM s'auto-phosphoryle notamment au niveau de la Sérine 1981 (Bakkenist et Kastan, 2003) puis phosphoryle de très nombreux substrats dont H2AX qui contribuera au recrutement des protéines de réparation pour former ainsi les foyers DDR.

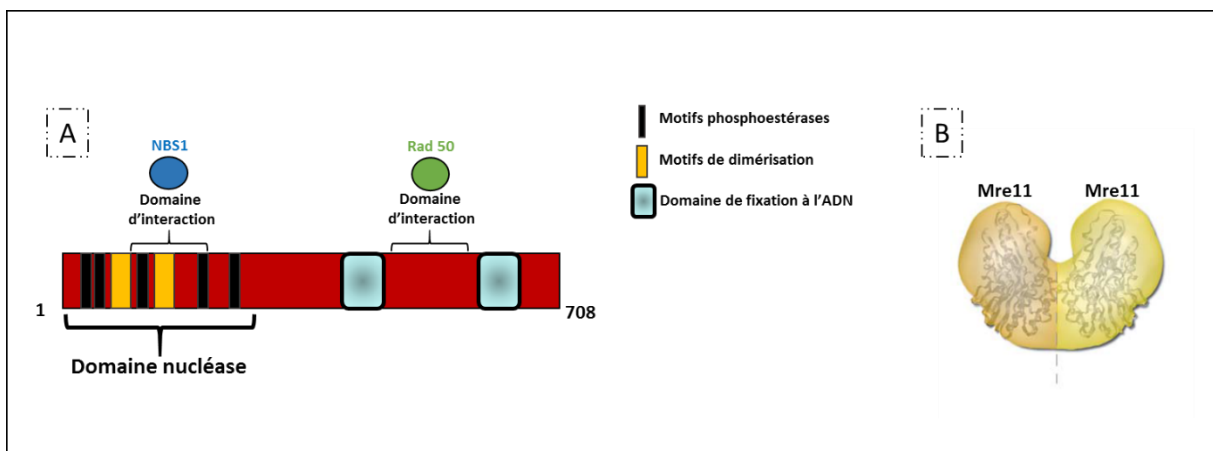
Initialement, les gènes codant les différents composants du complexe MRN ont été découverts chez la levure et plus précisément dans des souches mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* qui étaient hypersensibles aux agents endommageant l'ADN. En ce qui concerne la protéine Rad50 (pour Radiation sensitive 50), il a été établi en 1970 lors d'une conférence internationale sur la génétique des levures que les loci conférant une sensibilité accrue aux rayons X porteraient le symbole *rad* (Game et Mortimer, 1974). Pour la protéine Mre (Meiotic recombinaison 11), elle a été isolée à partir de souches mutantes présentant un défaut de fonctionnement pour la recombinaison méiotique (Ajimura et al., 1993)

Le complexe MRN est indispensable pour la maintenance de l'intégrité génomique et principalement pour la réponse aux cassures double brin puisque des mutations dans n'importe quelle protéine du complexe génèrent des troubles génétiques, une hypersensibilité aux radiations ionisantes et surtout une instabilité génétique.

#### 2.1.2.1 La protéine Mre11

La protéine Mre11 est une nucléase de 708 acides aminés caractérisée par plusieurs domaines fonctionnels (Figure 14A). Au niveau de la région N-terminale, on retrouve plusieurs motifs phosphoestérase lui conférant son rôle de nucléase. En effet, ces motifs permettent à Mre11 d'hydrolyser des résidus phosphoesters au niveau de l'ADN. Mre11 est la protéine centrale du complexe MRN puisqu'elle peut former différents complexes avec les protéines Rad50 et NBS1 (Usui et al., 1998 ; Desai-mehta et al., 2001). Au niveau N-terminal, on retrouve également deux motifs responsables de l'homodimérisation de Mre11. En effet, pour être active, celle-ci a

besoin de se dimériser. Cette dimérisation formera un complexe en forme de U (Hopfner et al., 2001) (Figure 14B) et permettra sa fixation au niveau de l'ADN et l'interaction avec les autres membres du complexe. Mre11 peut former des homodimères mais également des tétramères au sein du complexe MRN. Pour finir, son domaine N-terminal permet l'interaction avec la protéine NBS1. Au niveau de la région C-terminale, on retrouve le domaine d'interaction avec la protéine Rad 50 entouré de deux domaines de fixation à l'ADN. La protéine Mre11 possède plusieurs activités enzymatiques. D'une part, elle possède une activité de dégradation exonucléolytique de 3' vers 5' au niveau des cassures double brin de l'ADN ce qui facilite la réparation des DSBs (Paull et Gellert, 1998). Dans cette étude, les auteurs ont montré in vitro que Mre11 possédait une activité exonucléase et que celle-ci augmentait quand Mre11 était complexée avec la protéine Rad50. D'autre part, Mre11 possède aussi une activité endonucléase mais cette fois-ci au niveau des simples brin de l'ADN. En effet, plusieurs études effectuées chez *Saccharomyces cerevisiae* ont démontré plusieurs rôles pour la protéine Mre11.



**Figure 14 : Structure de la protéine Mre11. A : Représentation schématique des différents domaines de Mre11. B : Représentation d'un homodimère de Mre11 (Rupnik et al., 2010)**

Premièrement, l'équipe a démontré grâce à l'utilisation de mutants ponctuels que la mutation Mre11D16A menait à l'abolition de l'activité exonucléase de Mre11 et que des protéines tronquées au niveau de la région C-terminale possédaient une activité enzymatique exonucléase intacte alors que leur capacité à se fixer au niveau de l'ADN était fortement altérée (Furuse et al., 1998). Deuxièmement, l'équipe de Usui en 1998 a démontré un rôle de Mre11 dans la formation des cassures double brin pendant la

méiose. Pour compléter, une revue qui résume les différents rôles de Mre11 chez *Saccharomyces cerevisiae*, en décompte au total 7 dont un rôle dans la maintenance des télomères, dans la recombinaison non homologue et homologue mais également un rôle au cours de la méiose (Haber, 1998).

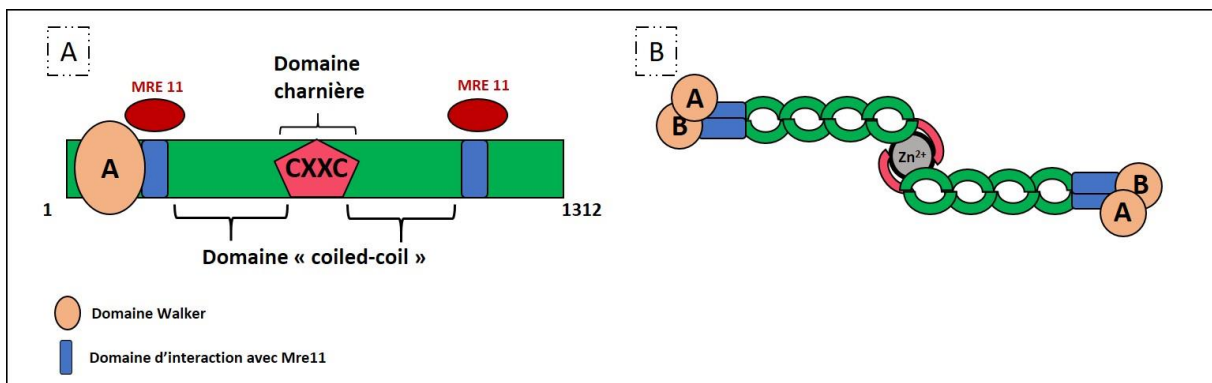
Finalement, il a été proposé que Mre11 permettrait d'induire une cassure simple brin au niveau de l'ADN via son activité endonucléase puis digérerait l'ADN vers la cassure double brin via son activité exonucléase. En effet, une très belle étude utilisant les rayons X et la structure cristallographique de Mre11 a démontré que l'activité endonucléase de Mre11 permet l'ouverture de la double hélice de l'ADN alors que son activité exonucléase facilite la production d'un ADN simple brin facilitant ainsi l'accès aux protéines de réparation telles que les protéines RPA (Williams et al., 2008).

#### 2.1.2.2 La protéine Rad 50

La protéine Rad 50 est une ATPase de 1312 acides aminés faisant partie de la famille SMC pour Structural Maintenance of Chromosome. Cette famille permet la condensation des chromosomes. D'un point de vue structure, cette protéine possède deux motifs de Walker A et B au niveau de la région N et C-terminale respectivement (Figure 15A). Ces motifs sont conservés et sont caractérisés par la présence de séquence consensus : G-x(4)-GK-[TS], où G, K, T et S représente respectivement une Glycine, une Lysine, une Thréonine et une Sérine pour le motif de Walker A, et [RK]-x(4)-G-x(4)-LxxxD, où R, K, G, L et D représente respectivement une Arginine, une Lysine, une Glycine, une Leucine et un acide Aspartique pour le motif de Walker B (Walker et al., 1982). Ces motifs sont importants pour l'activité ATPasique de Rad50 (Chen et al., 2005) et formeront la tête globulaire de la protéine. La liaison d'une molécule d'ATP au niveau de ces domaines induit un changement de conformation de la protéine Rad50. Une très grande région centrale en forme de double spirale appelée « coiled coil » sépare les deux domaines Walker A et B. Au centre de celle-ci se trouve un motif conservé et spécifique CXXC. Ce motif est au cœur d'une région charnière en forme de crochet qui permet à la protéine de se replier sur elle-même et d'adopter une conformation spatiale particulière et spécifique de la protéine Rad50 (Figure 15B). Les domaines « coiled coil » interagissent entre eux de façon antiparallèle. Ce repliement permet également de rapprocher les domaines Walker A et B pour former la tête globulaire. A proximité des domaines Walker, se trouvent les deux domaines

d'interaction avec la protéine Mre11. Ainsi, le repliement de la protéine Rad50 via le domaine charnière permettra de rapprocher les domaines ATPasique de Rad50 des domaines d'interactions avec Mre11 qui comme décrit précédemment, est dépendante de l'ATP (Paull et Gellert, 1999).

La région charnière est dépendante du zinc et permet également la dimérisation de la protéine via le motif XCCX (Hopfner et al., 2001). Une étude chez la levure a montré que des mutations au niveau de ce motif conduisent à une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et affectent fortement l'interaction avec la protéine Mre11 (Hopfner et al., 2001). Ainsi, la conformation spatiale de chaque protéine au sein du complexe MRN est importante pour la fonctionnalité de ce complexe. Rad50 complexée avec la protéine Mre11 atteint une taille critique de 1.3MDa. En fonction du ratio molaire des différentes protéines du complexe MRN, on peut observer la formation de différents complexes (pour revue, Rupnik et al., 2010). Par exemple, Chen et al., en 2001 ont purifié chez la levure le complexe MRN et ont déterminé un ratio 2.2.1, ce qui signifie la formation d'un complexe composé de 2 protéines Mre11, 2 protéines Rad50 et 1 protéine NBS1.



**Figure 15 :** Structure de la protéine Rad50. A : Représentation schématique des différents domaines de Rad50. B : Dimérisation de la protéine Rad50 via son domaine charnière dépendant du zinc.

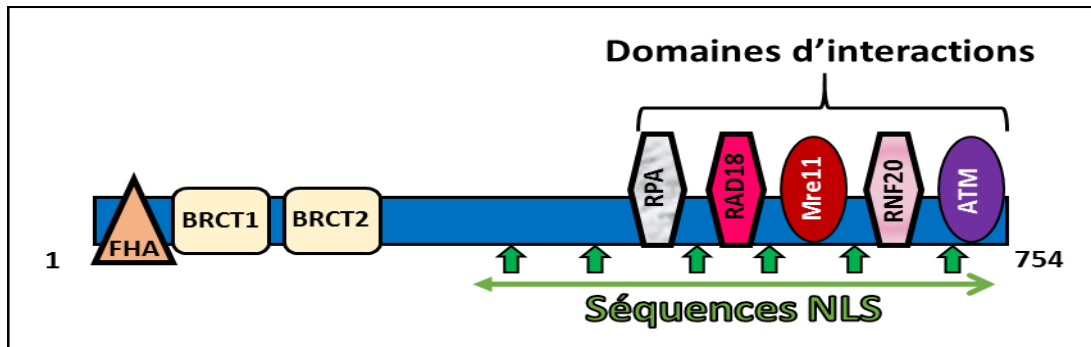
### 2.1.2.3 La protéine NBS1

NBS1 est une protéine nucléaire ubiquitaire composée de 754 acides aminés. Celle-ci possède deux domaines fonctionnels en N et C-terminal respectivement. Contrairement aux deux autres membres du complexe MRN, la protéine NBS1 ne possède pas d'activité enzymatique mais agit en tant que protéine régulatrice du complexe MRN. Au niveau de la région N-terminale, on trouve un domaine FHA (Fork Head-Associated) et la répétition en tandem de deux domaines BRCT. Initialement, le

domaine FHA a été caractérisé chez des facteurs de transcription et au niveau de protéines kinases (Hofmann et Bucher, 1995). Ce domaine permet la reconnaissance de motifs phosphorylés au niveau de protéines régulatrices et plus précisément il reconnaît les Thréonines ou les Sérines phosphorylées. Les domaines FHA et BRCT sont requis pour l'interaction avec la protéine  $\gamma$ H2AX (Kobayashi et al., 2002). En effet, Kobayashi a montré par l'utilisation de protéines recombinantes que ces domaines sont essentiels à l'interaction physique entre les protéines NBS1 et  $\gamma$ H2AX puisque la perte de ces deux domaines empêche cette interaction. Ces domaines sont également impliqués dans l'interaction avec la protéine MDC1 (Chapman et Jackson, 2008) au niveau des domaines  $\gamma$ H2AX (Figure 13). En effet, Chapman a montré que la protéine MDC1 phosphorylée induit directement l'interaction avec NBS1 par les domaines BRCT et FHA via un motif phospho-Sérine. Ces deux domaines sont donc importants pour la stabilité génomique puisque la perte d'un de ces deux domaines entraîne une sensibilité aux agents endommageant l'ADN.

La région C-terminale est impliquée quant à elle, dans l'interaction avec d'autres protéines. En effet, au niveau de son extrémité on retrouve plusieurs courts motifs peptidiques responsables des interactions protéine-protéine. Premièrement, un court motif de 8 acides aminés situé entre les positions 683 et 691 est responsable de l'interaction avec la protéine Mre11 et deuxièmement un motif un peu plus grand situé entre les positions 734 et 784 permet l'interaction avec la protéine kinase ATM (Falck et al., 2005). Grâce à des études de protéomique, l'équipe de Jacob Falck a démontré que seulement 20 acides aminés situés au niveau de la région C-terminale étaient suffisants pour interagir avec la protéine kinase ATM.

En plus de ces deux courts motifs, la région C-terminale de la protéine NBS1 est le siège d'interaction avec 3 autres protéines au niveau de régions conservées chez les vertébrés (Figure 16). En effet, on retrouve un domaine d'interaction pour la protéine Rad18, RPA et aussi RNF20 (Komatsu, 2016).



**Figure 16 : Représentation schématique de la structure de la protéine NBS1 adaptée de (Komatsu, 2016).**

En fonction de ces interactions, la protéine NBS1 joue de nombreux rôles au niveau cellulaire. D'une part, elle permet le remodelage de la chromatine au niveau des DSBs grâce à l'action de la protéine RNF20. Elle permet également la synthèse d'ADN via la protéine Rad18 et d'autre part, elle permet la régulation des points de contrôle de cycle cellulaire en réponse aux DSBs par l'action de la kinase ATM. Malgré le fait que la protéine NBS1 ne possède pas d'activité enzymatique, elle est considérée comme la protéine régulatrice du complexe MRN. En effet, celle-ci permet d'une part aux protéines Rad50 et Mre11 d'être localisées au niveau nucléaire puisque seule la protéine NBS1 possède plusieurs domaines de localisation nucléaire (NLS) au niveau de sa structure peptidique (Figure 16). NBS1 permet la localisation nucléaire du complexe MRN mais également la formation de foyers DDR après l'induction de DSBs par irradiation (Desai-mehta et al., 2001). D'autre part, NBS1 stimule l'activité des protéines Rad50 et Mre11 (Lee et al., 2003; Paull et Gellert, 1999). Dans l'étude de Lee et al., les auteurs montrent que la protéine NBS1 régule la fonction de Rad50 en modulant l'activité de fixation au niveau de l'ADN et que la région C-terminale de la protéine NBS1 était suffisante pour stimuler l'activité du complexe MRN en réponse aux DSBs.

## 2.2 Rôle de la protéine kinase ATM dans la recombinaison homologue

Décrite comme étant une protéine senseur de la DDR, ATM reconnaît les dommages à l'ADN et transmet l'information aux protéines effectrices. A leur tour, celles-ci réguleront les points de contrôle du cycle cellulaire afin de permettre l'activation des voies de signalisation, l'activation de la réponse transcriptionnelle et/ou l'induction de la mort cellulaire si les dommages sont trop importants.

### 2.2.1 Structure de la protéine kinase ATM

La protéine kinase ATM est ubiquitaire, elle est composée de 3056 acides aminés pour une taille de 350 kDa. Elle est principalement mais pas exclusivement localisée au niveau nucléaire. En effet, une étude portant sur l'expression de la protéine ATM au cours du développement des neurones chez l'homme a montré que la protéine ATM était localisée dans le cytoplasme des cellules du Purkinje au niveau du cortex cérébral (Oka et Takashima, 1998).

Cette protéine kinase fait partie de la famille PIKK comme la kinase DNA-PK. Ainsi, celle-ci est constituée d'une région C-terminale composée d'un domaine PI3K et de domaines FAT et FATC très conservés (Figure 5). La région N-terminale est constituée principalement de domaines HEAT permettant l'interaction avec d'autres protéines.

Initialement, la protéine ATM fut découverte chez des personnes atteinte d'une maladie nommée AT pour « Ataxia Telangiectasia ». C'est une maladie héréditaire rare qui touche essentiellement les enfants. Aux Etats Unis, une étude sur l'incidence de la maladie AT a montré que 1 enfant sur 40 000 à 100000 naissances en était atteint (Swift et al., 1986). Cette maladie se transmet de façon autosomique récessive et se caractérise par une dégénérescence cérébelleuse, de graves défauts au niveau du système immunitaire, une sensibilité aux radiations ionisantes, une instabilité génomique et une très grande prédisposition au développement de cancers (Crawford, 1998). Chez ces patients, la protéine ATM fut associée à la réponse aux dommages à l'ADN et à la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire puisque l'on retrouvait essentiellement des dysfonctionnements au niveau de ces mécanismes cellulaires.

### 2.2.2 Activation de la kinase ATM par le biais de modifications post-traductionnelles

Dans une cellule normale et non irradiée, la protéine kinase ATM existe sous la forme de dimère inactif. C'est sous cette forme que le complexe MRN via le domaine C-terminal de la protéine NBS1 la recrute. Suite à ce recrutement, le domaine kinase d'une protéine ATM va autophosphoryler l'autre domaine kinase au niveau de la Sérine 1981. Ce phénomène d'autophosphorylation intermoléculaire permet le passage de la forme dimérique inactive à la forme monomérique active de la protéine kinase ATM (Bakkenist et Kastan, 2003).

Suite à l'induction de DSBs, de nombreuses études ont montré que la protéine kinase ATM s'autophosphoryle sur de nombreux sites. Tout d'abord, en 2003 une étude *in vitro* par des expériences d'immunoprécipitations a démontré que l'activation d'ATM est dépendante de la molécule d'ATP et que son activation nécessite un mécanisme d'autophosphorylation (Kozlov et al., 2003). Puis, en 2006, les mêmes auteurs ont découvert de nouveaux sites d'autophosphorylation incluant la Sérine 367 et la Sérine 1893 (Kozlov et al., 2006). Pour complexifier encore le système, en 2011 d'autres sites sont venus s'ajouter à la liste. Il s'agit de la Thréonine 1885 et de la Sérine 2996 (Kozlov et al., 2011). En effet, cette étude montre la complexité des mécanismes d'activation de la protéine kinase ATM par le biais de modifications post traductionnelles telle que la phosphorylation. Les auteurs montrent que la phosphorylation de la Sérine 367 et de la Sérine 2996 sont abolies en présence d'un inhibiteur spécifique de la kinase ATM et qu'elles sont dépendantes de la présence du complexe MRN. De plus, elles sont détectées suite à l'induction de DSBs par irradiation au niveau des DSBs. Par contre, elles ne sont pas impliquées dans le recrutement de la kinase ATM au niveau des sites de DSBs. Cependant, elles restent tout de même importantes puisque des formes mutantes de la protéine ATM affectant ces sites de phosphorylations montrent un défaut au niveau du point de contrôle de l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Kozlov et al., 2011).

Néanmoins, la phosphorylation de la protéine kinase ATM n'est pas la seule modification post traductionnelle impliquée dans l'activation de cette protéine. En effet, l'acétylation joue également un rôle primordial dans l'activation de la protéine kinase ATM. Une étude de 2005 a montré l'implication d'une histone acétyl-transférase Tip60 dans l'activation d'ATM en réponse aux dommages à l'ADN (Sun et al., 2005). Cette étude démontre que Tip60 se complexe avec la protéine ATM au niveau de son domaine FATC permettant ainsi son activation par acétylation. Plus tard, la même équipe fait la découverte d'un site unique d'acétylation par Tip60 au niveau de la Lysine 3016 de la protéine ATM suite à l'induction de DSBs (Sun et al., 2007). Cette étude montre l'importance de cette modification post traductionnelle puisque des mutations touchant ce résidu se traduisent par un défaut d'activation de la protéine ATM via le passage de la forme dimérique inactive à la forme monomérique active, ainsi qu'une dérégulation des voies en aval de la protéine kinase ATM. En effet, les auteurs observent une dérégulation de la phosphorylation de protéines en aval telles que Chk2 et P53 (voir section 2.2.4), impliquées dans la signalisation des checkpoints du cycle



cellulaire. Ainsi, les auteurs démontrent que cette acétylation permet l'activation du domaine kinase de la protéine ATM suite à l'induction de DSBs.

### 2.2.3 Relation étroite entre la protéine kinase ATM et le complexe MRN

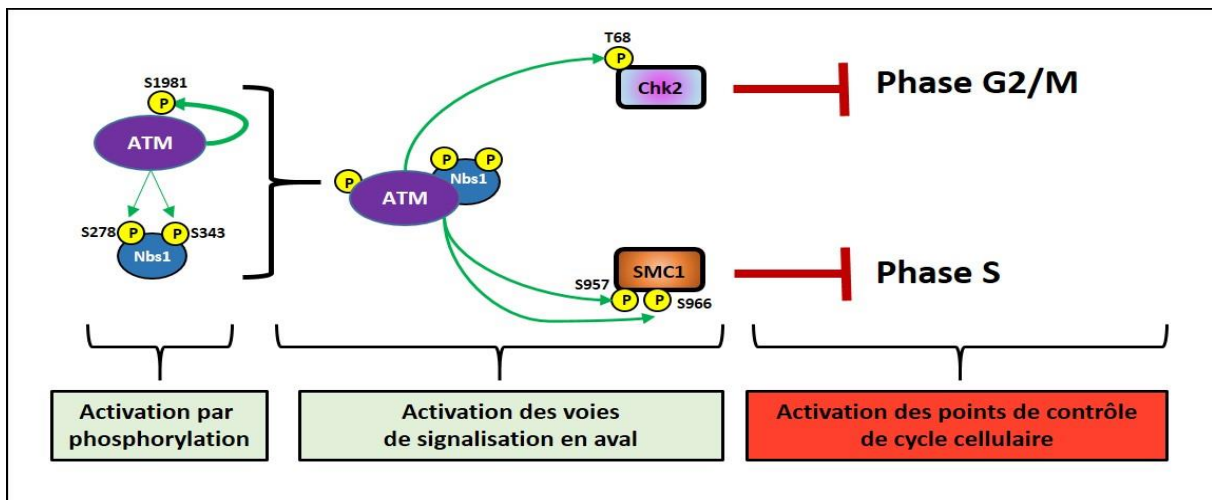
Le complexe MRN recrute la protéine Kinase ATM au niveau des DSBs comme décrit précédemment. En effet, il a été démontré que la partie C-terminale de la protéine NBS1 est impliquée dans le recrutement d'ATM (Falck et al., 2005). En plus de cette découverte, une relation fonctionnelle étroite entre le complexe MRN et la protéine kinase ATM fut démontrée chez des patients atteints de différentes maladies rares touchant les membres du complexe MRN. La première est une maladie touchant la protéine NBS1 nommée NBS pour « Nijmegen breakage syndrome », la seconde touchant la protéine Rad50 nommée NBLD pour « Nijmegen breakage like disorder » et la troisième touchant la protéine Mre11 nommée ATLD pour « Ataxia-telangiectasia like disorder ». Les patients atteints de ces différentes maladies montraient des caractéristiques phénotypiques similaires à celles que l'on pouvait observer chez les patients atteints de la maladie AT (paragraphe 2.2.1) (Table 2) suggérant ainsi un lien fonctionnel étroit entre le complexe MRN et la protéine kinase ATM (Carney et al., 1998 ; Stewart et al., 1999 ; Lee et al., 2003 ; Regal et al., 2013).

En 2003, l'équipe de Uziel a montré que la localisation nucléaire ainsi que l'activation de la kinase ATM étaient altérées dans des cellules issues de patients NBS et encore plus chez des patients ATLD. De plus, il a clairement été démontré l'existence d'un dialogue entre les membres du complexe MRN et la protéine kinase ATM par le biais de modifications post traductionnelles et notamment par l'intermédiaire de la phosphorylation. En effet, la protéine kinase ATM possède un répertoire considérable de substrats parmi lesquels on retrouve les trois membres du complexe MRN.

Genetic disorder	Abbreviation	Gene/Protein	Neurological features	Cancer pre-disposition	Chromosomal instability	Radio-sensitivity	Cell cycle checkpoint defect	DNA DSB repair defect
Nijmegen breakage syndrome	NBS	NBN/Nbs1	Microcephaly; Mental retardation	Yes	Yes	++++	Yes	Yes
Nijmegen breakage-like disorder	NBLD	Rad50	Microcephaly; Mental retardation	?	Yes	++	Yes	Yes
Ataxia-telangiectasia-like disorder	ATLD	Mre11	Cerebellar ataxia; Ocular apraxia; microcephaly (2 patients)	Yes	Yes	++	Yes	Yes
Ataxia telangiectasia	A-T	ATM	Cerebellar ataxia; Ocular apraxia	Yes	Yes	++++	Yes	Yes

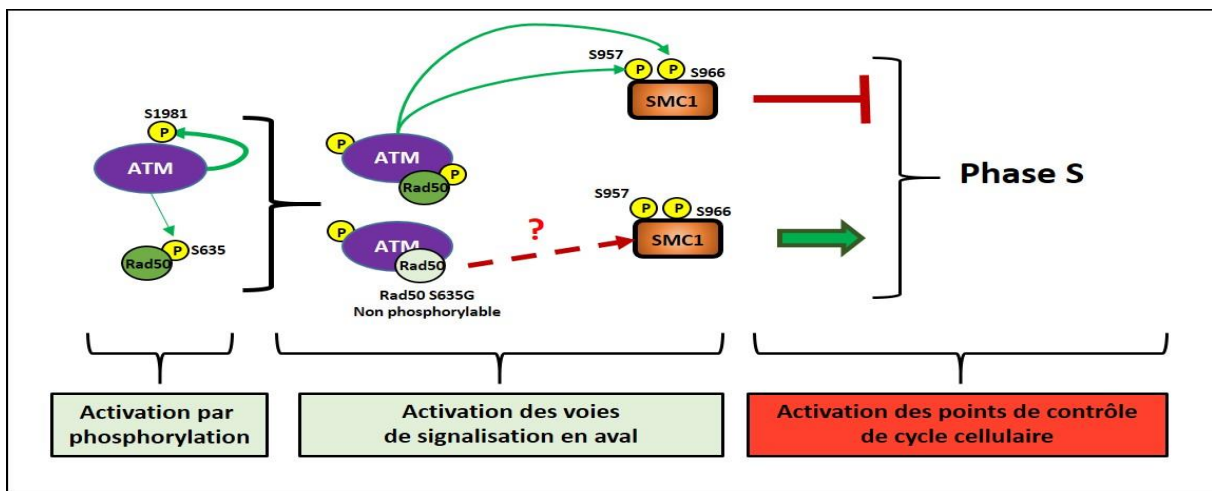
***Table 2 : Caractéristiques phénotypiques des différentes maladies touchant le complexe MRN et la protéine ATM (d'après Lavin et al., 2015)***

Tout d'abord, une étude a montré qu'en réponse aux radiations ionisantes, ATM phosphoryle NBS1 au niveau de deux sites qui sont la Sérine 278 et 343 et que ces phosphorylations sont importantes pour la signalisation des dommages à l'ADN (Zhao et al., 2000). Ces phosphorylations sont importantes pour la régulation des différents points de contrôle du cycle cellulaire notamment au niveau du checkpoint de l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Zhao et al., 2000) mais également au niveau du point de contrôle G2/M (Li et Wang, 2011 ; Buscemi et al., 2001). Au niveau du checkpoint G2/M, ces phosphorylations permettraient d'activer la voie de signalisation ATM/Chk2. En effet, ces phosphorylations permettraient à ATM de phosphoryler la protéine kinase effectrice Chk2 impliquée dans la régulation de ce point de contrôle (Li et Wang, 2011 ; Buscemi et al., 2001) (voir paragraphe sur ATM et cycle cellulaire). Ce rôle est controversé puisqu'une étude de 2016 a démontré chez des patients atteints de NBS possédant une forme mutée de la protéine NBS1, que la voie ATM/Chk2 n'était pas affectée. D'autre part, ces phosphorylations permettraient également d'activer la voie ATM/SMC1 (Li et Wang, 2011 ; Yazdi et al. 2002). En effet, Yazdi et al., viennent complexifier les choses en démontrant que la phosphorylation de NBS1 par ATM est requise pour la phosphorylation de la protéine SMC1 et que la phosphorylation de SMC1 au niveau des résidus Sérine 957 et Sérine 966 par la protéine kinase ATM est requise pour l'activation du point de contrôle en phase S du cycle cellulaire. Ainsi NBS1 joue le rôle d'adaptateur pour les voies de signalisation ATM/NBS1/SMC1 et ATM/Chk2 au niveau des points de contrôle de l'entrée en phase M mais également en phase S du cycle cellulaire (Figure 17).



**Figure 17 : Rôles de la phosphorylation de NBS1 par ATM au niveau des checkpoints du cycle cellulaire**

Ensuite, la protéine kinase ATM phosphoryle la protéine Rad50 du complexe MRN sur un unique site au niveau de la Sérine 635 (Gatei et al., 2011). Cette phosphorylation est importante dans la signalisation des points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 18). En effet, l'équipe de Gatei a montré *in vitro* dans des cellules déficientes pour Rad50 que l'utilisation d'une protéine mutante non phosphorylable Rad50 S635G menait à une altération du point de contrôle de la phase S via la voie de signalisation ATM/SMC1 malgré l'activation normale de la protéine kinase ATM (Figure 18).

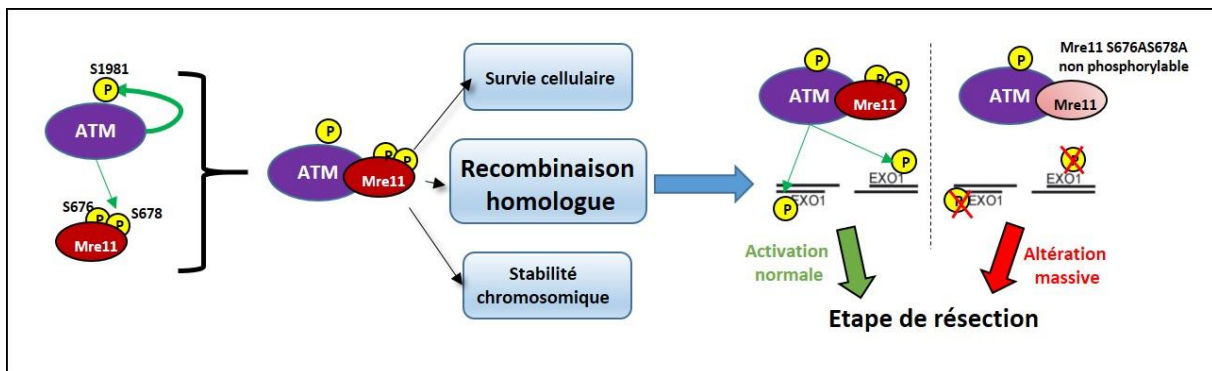


**Figure 18 : Rôle de la phosphorylation de Rad50 par ATM au niveau des checkpoints du cycle cellulaire**

Pour terminer, la protéine kinase ATM phosphoryle la protéine Mre11 au niveau de deux sites très proches l'un de l'autre, il s'agit des Sérine 676 et 678 (Kijas et al., 2015).

Cette équipe a montré que cette phosphorylation avait un rôle dans la survie cellulaire, la stabilité chromosomique, la réparation des dommages à l'ADN et de façon plus précise dans l'étape de résection de l'ADN par l'intermédiaire de l'exonucléase EXO1. En effet, l'utilisation d'une protéine mutée non phosphorylable Mre11 S676A et S678A empêche la phosphorylation par la kinase ATM de la protéine EXO1 menant à une altération de la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue (Figure 19).

Il a également été montré que la forme hyper phosphorylée de la protéine Mre11 permet l'inactivation du complexe MRN par sa dissociation depuis la chromatine permettant ainsi une régulation négative de la réponse aux dommages à l'ADN à la suite de la réparation des cassures double brin (Michela et Ying, 2009).

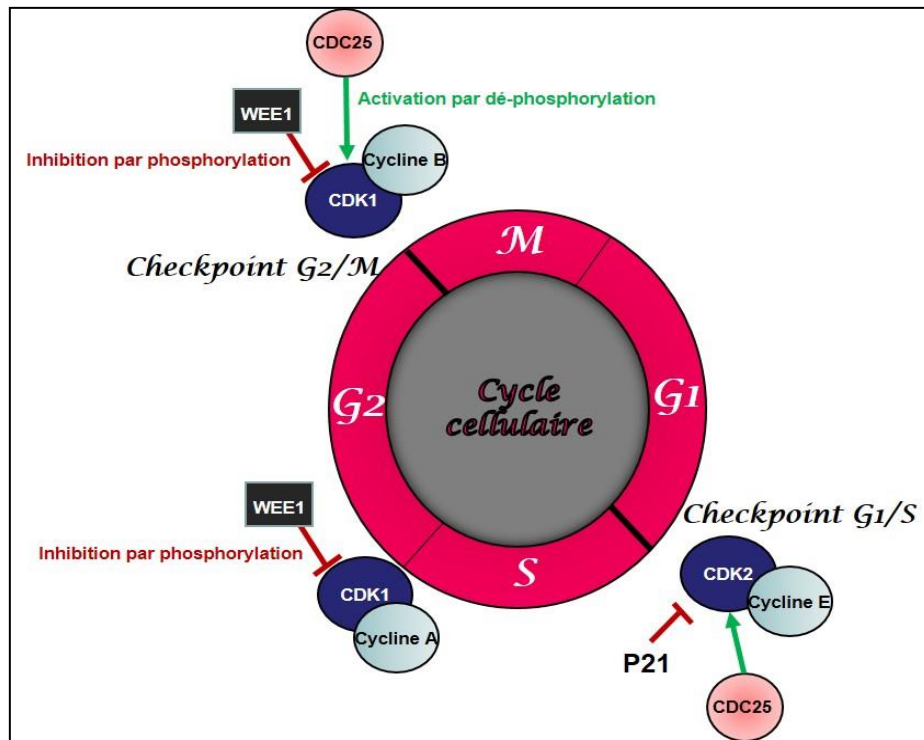


**Figure 19 : Rôle de la phosphorylation de la protéine Mre11 par ATM**

#### 2.2.4 Rôle de la kinase ATM au niveau du cycle cellulaire

Afin de permettre la réparation des DSBs, les cellules doivent dans un premier temps, stopper la progression du cycle cellulaire au niveau des différents « checkpoints » ou points de contrôle pour activer dans un second temps, les mécanismes de réparation ou induire la mort cellulaire par apoptose si les dommages sont trop importants. La protéine kinase ATM est essentielle pour l'activation des différents checkpoints du cycle cellulaire. Chez les organismes supérieurs, le cycle cellulaire est composé de quatre phases successives, la phase G2, la phase M, la phase G1 et la phase S. A chaque entrée de ces différentes phases, se trouve un point de contrôle permettant aux cellules de détecter des anomalies chromosomiques et d'empêcher les cellules de se multiplier en présence de dommages à l'ADN préservant ainsi la stabilité génomique. Ces différents points de contrôle ou « checkpoints » sont régulés par des complexes Cycline/CDK. Ces complexes sont également régulés à

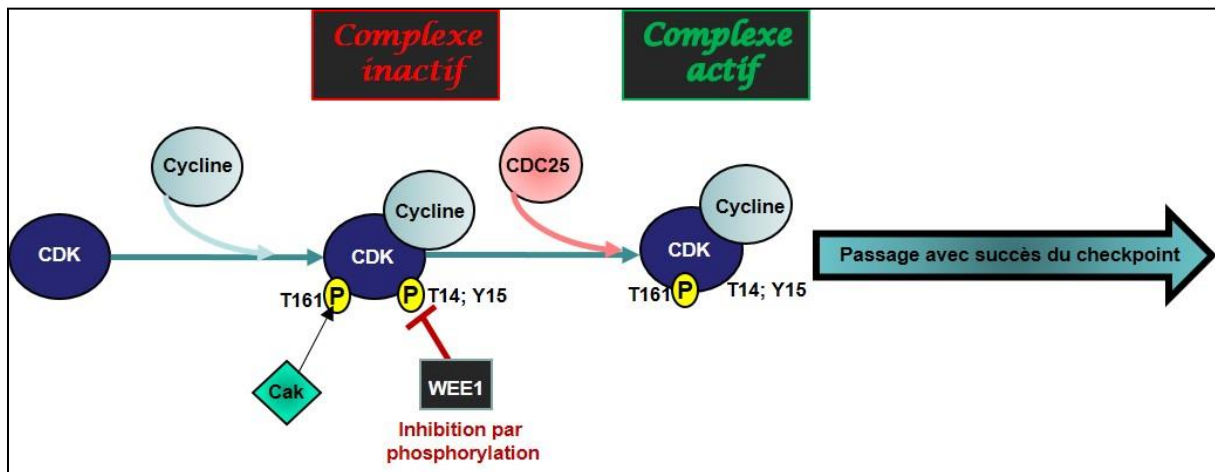
plusieurs niveaux et par différentes protéines (figure 20). En effet, les protéines kinases CDK sont régulées par les cyclines elles-mêmes dont l'expression évolue au cours du cycle cellulaire. Ensuite, les CDK sont aussi régulées par d'autres protéines kinases telles que Wee1 et CAK (Cdk Activating Kinase), mais également par des phosphatases et notamment par cdc25 et pour finir par des protéines inhibitrices les CDKi telles que p21 (Wade Harper et al., 1993), p16 (Serrano et al., 1993 ; Aprelikova et al., 1995) ou encore p27 (Polyak et al., 1994).



**Figure 20 :** Représentation simplifiée de la régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/CDKs

Comme nous le montre la Figure 20, plusieurs points de contrôles sont visibles au cours du cycle cellulaire notamment au niveau de l'entrée en phase S nommé checkpoint G1/S et au niveau de l'entrée en phase M nommé checkpoint G2/M. Ces points de contrôles sont régulés par les complexes CDK1/Cycline B pour le checkpoint G2/M et CDK2/Cycline E pour le checkpoint G1/S. Quel que soit le complexe impliqué, ceux-ci activent les différents checkpoints de la même façon mettant en jeu des mécanismes d'inhibition par phosphorylation via des protéines kinases et des mécanismes d'activation par déphosphorylation via des phosphatases. En effet, à l'état basal, le complexe CDK/Cycline est phosphorylé au niveau de la Thréonine 161

par la kinase Cak et au niveau de la Tyrosine 15 et de la Thréonine 14 par la protéine kinase wee1. De plus, l'intervention de la phosphatase cdc25 est essentielle puisque celle-ci permet le passage de la forme inactive du complexe CDK/Cycline à sa forme active en déphosphorylant la Tyrosine 15 et la Thréonine 14 permettant ainsi à la cellule d'accéder à la phase suivante du cycle cellulaire (Donzelli et Draetta, 2003) (Figure 21).



**Figure 21 : Mécanisme d'action des complexes CDK/Cycline au cours du cycle cellulaire (d'après Enserink, 2010)**

#### 2.2.4.1 Rôle lors du checkpoint G1/S

Initialement, en présence de dommages à l'ADN et principalement en présence de DSBs, la voie ATM/CHK2 est activée. En effet, la protéine kinase ATM va phosphoryler la protéine kinase effectrice CHK2 (Checkpoint kinase 2) au niveau de la Thréonine 68 pour que celle-ci puisse transmettre le message aux protéines médiatrices afin d'activer les signalisations de réparation des dommages perçus. Suite à cette phosphorylation, la protéine CHK2 s'oligomérisse et s'autophosphoryle au niveau des Thréonine 383 et 387 (Bartek et Lukas, 2003) induisant ainsi son activation totale (Xu et al., 2002) (Figure 22).

Une fois activée, CHK2 va phosphoryler de nombreuses cibles dont la protéine phosphatase cdc25 provoquant son inactivation et sa dégradation (Mailand, 2000). Ceci entraîne une accumulation de la protéine CDK2 complexée avec la cycline E sous la forme de complexe inactif provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Falck et al., 2001).

Si les dommages persistent, les protéines kinases ATM et CHK2 vont phosphoryler la protéine P53 au niveau de la Sérine 15 et de la Sérine 20 respectivement afin de la stabiliser. De plus, la protéine kinase ATM va phosphoryler au niveau de la Sérine 395 la protéine MDM2, protéine connue comme étant principalement responsable de la dégradation de P53, renforçant ainsi la stabilité de la protéine P53 (Maya et al., 2001). La stabilisation de la protéine P53 mènera alors à l'activation de la transcription de gènes cibles dont la protéine p21 qui permettra l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de la voie apoptotique (Bartek et Lukas, 2001).

Les protéines kinase ATM et CHK2 phosphorylent également la protéine E2F1 au niveau de la Sérine 31 et de la Sérine 364 respectivement pour la stabiliser permettant ainsi l'activation de la transcription de certains gènes cibles pour activer la voie apoptotique (Lin et al., 2001;Stevens et al., 2003).

#### 2.2.4.2 Rôle lors du checkpoint G2/M

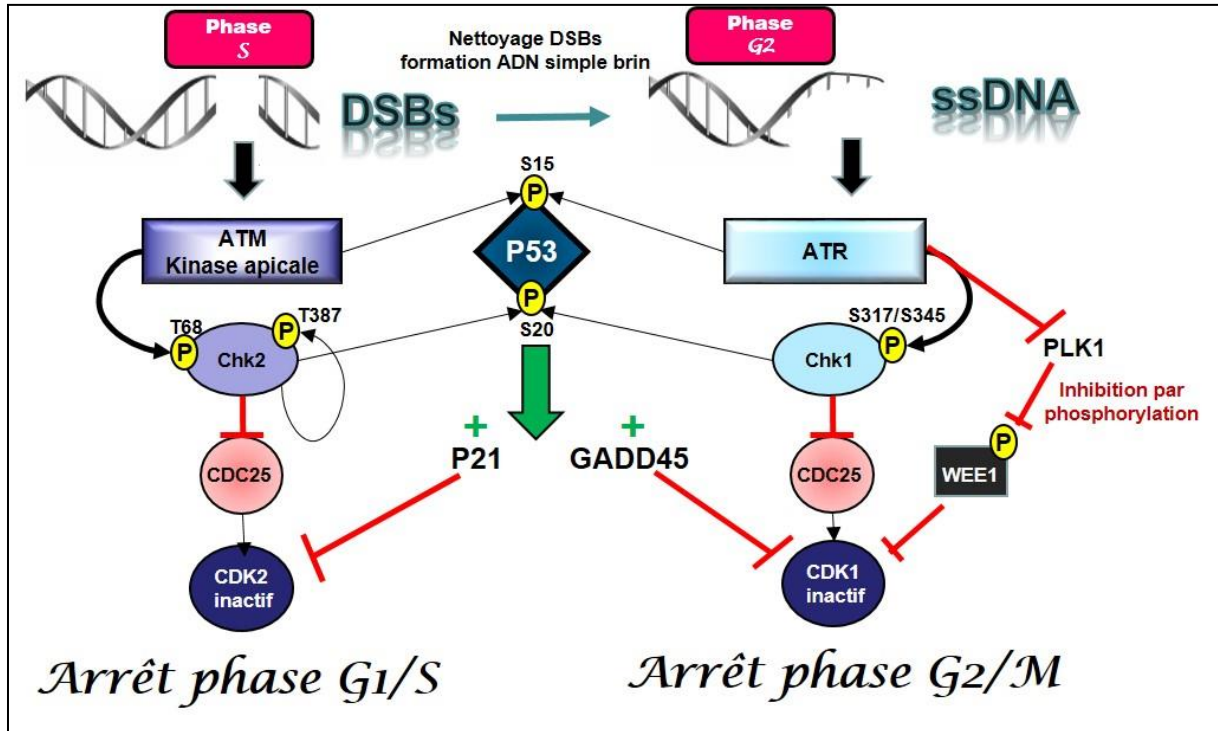
Pour rappel, ce point de contrôle est gouverné par le complexe CDK1/Cycline B. Ce point de contrôle est principalement activé en présence de cassures simple brin. Ainsi l'activation de la voie ATR/Chk1 est prédominante au niveau de ce point de contrôle. En présence de cassures simple brin, la protéine kinase ATR va phosphoryler la protéine effectrice Chk1 au niveau des Sérine 317 et 345 (Bartek et Lukas, 2003). Suite à cette activation, la protéine Chk1 pourra alors phosphoryler la phosphatase cdc25 au niveau de nombreux résidus dont la Sérine 123, la Sérine 178, la Sérine 278 et la Sérine 292 conduisant ainsi à l'inhibition de la protéine cdc25 (Sorensen et al., 2003) suivie de sa dégradation par ubiquitination via la phosphorylation au niveau de la Sérine 76 (Jin et al., 2003). Ces événements de phosphorylation par lesquels Chk1 induit l'inhibition de la phosphatase cdc25 sont également utilisés par la protéine Chk2 au niveau du checkpoint G1/S et permettent dans les deux cas l'arrêt du cycle cellulaire.

Comme pour la protéine kinase ATM, la protéine kinase ATR va phosphoryler la protéine P53 ainsi que la protéine MDM2 au niveau de sa Sérine 407 (Shinozaki et al., 2003) ce qui participe à la stabilisation de P53 et l'activation de gènes cibles dont GADD45 (Taylor et Stark, 2001).

Pour finir, la protéine kinase ATR inhibe la polo kinase 1 Plk1 induisant ainsi son inactivation. Ceci permet une accumulation de la protéine kinase Wee1 induisant ainsi



une réduction de l'activité de la protéine CDK1 (Guardavaccaro et Pagano, 2006). En effet, au cours de la transition normale du passage de la phase G2 à la phase M, la protéine Plk1 phosphoryle la protéine Wee1 induisant sa dégradation et l'entrée en phase M.



**Figure 22 :** Principaux rôle de la kinase ATM dans la régulation des points de contrôle G1/S et G2/M (adapté de Lopez-Contreras et Fernandez-Capetillo, 2012)

### 3/ D'autres modifications post-traductionnelles intervenant dans la réparation des DSBs

#### 3.1 La SUMOylation

La SUMOylation est une modification post traductionnelle qui cible les Lysine présentes dans un consensus classique  $\psi$ K $\chi$ E ou  $\psi$  est un acide aminé hydrophobe. Cette MPT consiste en la liaison covalente d'une protéine de 110 acides aminés appelée SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) et fait intervenir des enzymes spécifiques : l'enzyme E1 responsable de l'activation de la protéine SUMO, l'enzyme de conjugaison E2 qui permet la liaison au substrat grâce à l'intervention d'une enzyme E3 ligase qui confère une certaine spécificité à la réaction.

Il existe plusieurs enzymes E1 dont les protéines Aos1 qui est formée par l'association de SAE1 et SUA1 (Johnson et al., 1997), et l'enzyme SAE2. En ce qui concerne l'enzyme de conjugaison E2 il existe une unique protéine nommée ubc9 chez les



mammifères contre 13 chez la levure (Schwarz et al., 1998). Pour les enzymes E3 ligases, il existe 3 types différents. On retrouve les enzymes PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT), les enzymes RanBP2 (Ran Binding Protein2) et PC2 (Polycomb group). La famille PIAS est composée de 4 membres chez les mammifères : PIAS 1, PIAS 2, PIAS 3 et PIASx (PIAS $\alpha$  et PIAS $\beta$ ).

Outre le site classique de reconnaissance de la protéine SUMO, il existe d'autres consensus particuliers qui permettent également la SUMOylation des protéines. Parmi ces consensus, deux sont souvent observés. Il s'agit des consensus :

- $\Psi KxExx(E/D)_n$  : les acides aminés E (acide Glutamique) et D (acide Aspartique) représente une charge négative augmentant l'affinité de fixation de l'enzyme de conjugaison ubc9 (Yang et al., 2006),
- $\Psi KxExxS/TP$  : la phosphorylation de la Sérine ou de la Thréonine promeut la SUMOylation de la Lysine précédente (Yang et Grégoire, 2006). Citons l'exemple de la protéine P53. La phosphorylation de la Sérine 20 de P53 par la kinase Chk2 favorise sa SUMOylation. De plus, la SUMOylation de la Lysine 386 de P53 promeut la phosphorylation de la Sérine 392.

La SUMOylation est une MPT qui pour un substrat donné affecte un faible pourcentage de protéine, environ 5 à 10% ; c'est le paradoxe de SUMO relevé par R. Hay (Hay et al., 2005). De plus, c'est également un mécanisme réversible qui fait intervenir de nombreuses « dé-SUMOyases » les protéines de la famille SENP (SENtrin/ SUMO specific Protease). Ces deux facteurs font que la détection de la SUMOylation de protéines au niveau endogène n'est pas toujours aisée. Cette MPT joue un rôle dans la répression transcriptionnelle puisque l'attachement d'une protéine SUMO au niveau des facteurs de transcription inhibe la transcription par recrutement de co-répresseurs transcriptionnels (Hay, 2005). Cependant ce n'est pas le seul rôle attribué à la SUMOylation. En effet, celle-ci permet l'association de protéine au niveau de l'ADN telle que Ku70 (Hang et al., 2014), l'interaction entre différentes protéines, la dégradation de protéines telle que MDC1 (Luo et al., 2012), stimule l'activité de certaines protéines et notamment celle de BRCA1 (Morris et al., 2009) et joue un rôle dans la localisation des protéines telle que XRCC4 (Yurchenko et al., 2006).

Les protéines SUMO sont des protéines ubiquitaires exprimées chez tous les eucaryotes. Elles régulent positivement dans le cas de PLZF et OCT4 (Kang et al., 2003 ; Wei et al., 2007) ou négativement dans le cas de HSF (Anckar et al., 2006) la

liaison à l'ADN. Chez les vertébrés celles-ci sont divisées en 2 groupes : le premier groupe est composée exclusivement de la protéine SUMO1 et le second groupe est composé des protéines SUMO2 et 3. Entre ces deux groupes on retrouve 50% d'homologie de séquence. Les protéines SUMO 2 et 3 sont capables de former des chaînes poly-SUMO contrairement à la protéine SUMO 1 qui en est incapable.

### 3.2 Quelques exemples de protéines SUMOylées au cours de la réparation des dommages à l'ADN

**Les protéines 53BP1 et BRCA1** : une étude utilisant la microscopie à fluorescence et la micro irradiation laser a démontré l'implication de la protéine PIAS 1 dans la SUMOylation de la protéine BRCA1 via les protéines SUMO2 et 3 et l'implication de PIAS4 dans la SUMOylation de 53BP1 via la protéine SUMO 1 en réponse aux dommages à l'ADN (Galanty et al., 2009).

**La protéine Tip60** : Cheng a montré que la SUMOylation de Tip60 était nécessaire à la réponse aux dommages à l'ADN via la protéine P53. En effet, la SUMOylation de Tip60 initie sa relocalisation depuis le nucléoplasme vers les « nuclear bodies » ou corps PLM (Promyelocytic Leukemia). De plus, cette étude montre que la SUMOylation des Lysine 430 et 451 de Tip60 stimule son activité d'acétyl-transférase (Cheng et al., 2008).

**La protéine RPA** : pour rappel, cette protéine joue un rôle dans la réparation par recombinaison homologue lors de la formation du nucléo-filament indispensable pour l'invasion de l'ADN au niveau de la chromatide sœur homologue (Figure 12). Lors de cette étape, la protéine RPA va être SUMOylée au niveau des Lysine 449 et 577 (Dou et al., 2010). La SUMOylation de RPA va augmenter son affinité de fixation pour la protéine RAD 51 facilitant ainsi son recrutement au niveau du nucléo- filament (Ouyang et al., 2009).

**La protéine P53** : la SUMOylation de la Lysine 386 de la protéine P53 va stimuler sa capacité à activer la transcription de ces gènes cibles (Gostissa et al., 1999). La protéine P53 va également être régulée par les désSUMOylases SENP 1 et SENP 2. Tout d'abord, une étude a montré que l'inactivation de SENP 1 se traduit par une altération de l'activation de la voie apoptotique dépendante de la protéine P53 via la SUMOylation de SIRT1. En effet, pour être active la protéine P53 doit être acétylée. En condition normale, cette acétylation est inhibée par la déacétylase SIRT1 qui elle-

même est inactivée par la désSUMOylase SENP 1 (Yang et al., 2007) . Dans une autre étude, il a été montré que SENP 2 joue également un rôle dans la dégradation de la protéine P53 par l'intermédiaire de la protéine MDM2. En effet, les auteurs ont montré que SENP 2 va désSUMOyler la protéine MDM2, la rendant ainsi active. Celle-ci pourra alors s'associer avec la protéine P53 pour induire sa dégradation (Jiang et al., 2011).

### 3.3 La O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle réversible, qui consiste à l'ajout de résidus N-Acétyleglucosamine sur les Sérine ou Thréonine. Cette MPT fait intervenir deux enzymes : la O-linked N-acetyl-glucosaminyltransferase (OGT) qui utilise l'UDP-GlcNAc comme substrat et l'O-GlcNAcase (OGA) qui catalyse la réaction inverse. Cette MPT contrôle les activités cellulaires en fonction de la disponibilité en glucose. Dans la littérature, il est connu que le niveau de O-GlcNAcylation augmente suite aux radiations ultraviolet. De plus, une étude a montré que suite à ces radiations la protéine kinase DNA-PK était O-GlcNAcylée (Zachara et al., 2011). Une autre étude montre que la protéine P53 est O-GlcNAcylée sur la Sérine 149 (Yang et al., 2006). Cette MPT joue un rôle dans la stabilisation de P53 en empêchant la fixation de la protéine MDM2.

## **4/ Régulation du choix du mécanisme de réparation NHEJ ou HR ?**

Les dommages à l'ADN et notamment les cassures double brin sont réparés par deux mécanismes principaux qui sont la recombinaison homologue (HR) ou la recombinaison non homologue par ligation des extrémités, (NHEJ). Le choix entre ces deux mécanismes de réparation demande à la cellule une régulation extrêmement organisée et précise puisqu'un dysfonctionnement au niveau de cette régulation peut être à l'origine d'aberrations chromosomiques tels que des translocations ou des délétions chromosomiques mais également la perte d'hétérozygotie (LOH). Ces différentes aberrations vont provoquer une instabilité génomique qui aura pour conséquence l'induction de la tumorigénèse induisant de nombreux cancers.

Cette régulation s'effectue premièrement au niveau du cycle cellulaire et notamment via l'activation des différentes protéines qui contrôlent les Checkpoints G1/S et G2/M. Deuxièmement, la régulation se fera via les différentes interactions protéiques qui existent au sein de la cellule induites spécifiquement par la présence aux DSBs.

Notamment, les modulations d'activation de recrutement des différentes protéines « médiatrices » telles que BRCA1 et 53BP1 au niveau des DSBs par les modifications post traductionnelles des protéines histones situées au niveau de la chromatine (discuté plus loin : partie III) seront cruciales dans la décision du choix du mécanisme de réparation des dommages à l'ADN.

#### 4.1 Importance du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire va jouer un rôle essentiel dans le choix du mécanisme de réparation puisqu'en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle les DSBs se trouvent, les protéines impliquées seront différentes. Le choix du mécanisme va être dicté par les différents acteurs recrutés lors de l'activation ou de l'inhibition de l'étape de résection de l'ADN. Cette étape est indispensable à la formation d'un ADN simple brin qui permettra l'invasion au niveau du brin homologue de la chromatide sœur pour la réparation par HR. Cette étape requiert la phosphorylation de plusieurs protéines par les protéines kinases CDK dont l'activation est régulée différemment au cours des différentes phases du cycle cellulaire pour promouvoir la recombinaison homologue. Par exemple, la phosphorylation de la protéine EXO1 par les protéines CDK1 et CDK2 promeut l'étape de résection lors de la recombinaison homologue alors que la déphosphorylation de celle-ci augmente l'activité des protéines impliquées dans la NHEJ (Tomimatsu et al., 2014). De même, l'activation par phosphorylation de la protéine CtIP par les protéines CDK au niveau de la Sérine 327 et de la Thréonine 847 promeut le démarrage de l'étape de résection. Cette activation de CtIP est dépendante du cycle cellulaire. En effet, un faible niveau d'expression de CtIP est retrouvé en phase G1 alors que celui-ci est augmenté en phase S. Outre l'activation des CDK, l'activation des kinases ATM et DNA-PK est également importante. En effet, en phase S la protéine kinase ATM va recruter différentes protéines telles que les protéines du complexe MRN, la protéine BRCA1 et la protéine CtIP pour favoriser la HR (Yun et Hiom, 2009). De plus, en phase S l'activation de la protéine DNA-PK est altérée par une baisse de son activité kinase. Ceci se traduit par une diminution d'autophosphorylation de la Sérine 2056 et de la Thréonine 2609, nécessaires pour l'induction de la réparation par NHEJ, favorisant ainsi la réparation des DSBs par la recombinaison homologue (Chen et al., 2005). Une autre étude montre que la recombinaison homologue est stimulée quand la kinase DNA-PK est absente mais réprimée lorsque la phosphorylation de la Thréonine 2609 de la kinase DNA-PK est

inhibée chimiquement (Cui et al., 2005 ; Allen et al., 2003). Dans cette dernière étude, les auteurs émettent l'hypothèse d'une altération de la dissociation de la sous unité catalytique DNA-PKcs au niveau des extrémités des DSBs à l'origine d'un blocage des deux mécanismes de réparation NHEJ et HR. Cependant, en 2007 une étude a montré que la protéine kinase ATM participait à la phosphorylation de la Thréonine 2609 en réponse aux DSBs (Chen et al., 2007).

#### 4.2 Le rôle pivot des protéines BRCA1 et 53BP1

La balance entre le niveau d'expression de ces différentes protéines va moduler le choix de la signalisation à mettre en place en réponse aux DSBs par l'activation ou l'inhibition de l'étape de résection de l'ADN.

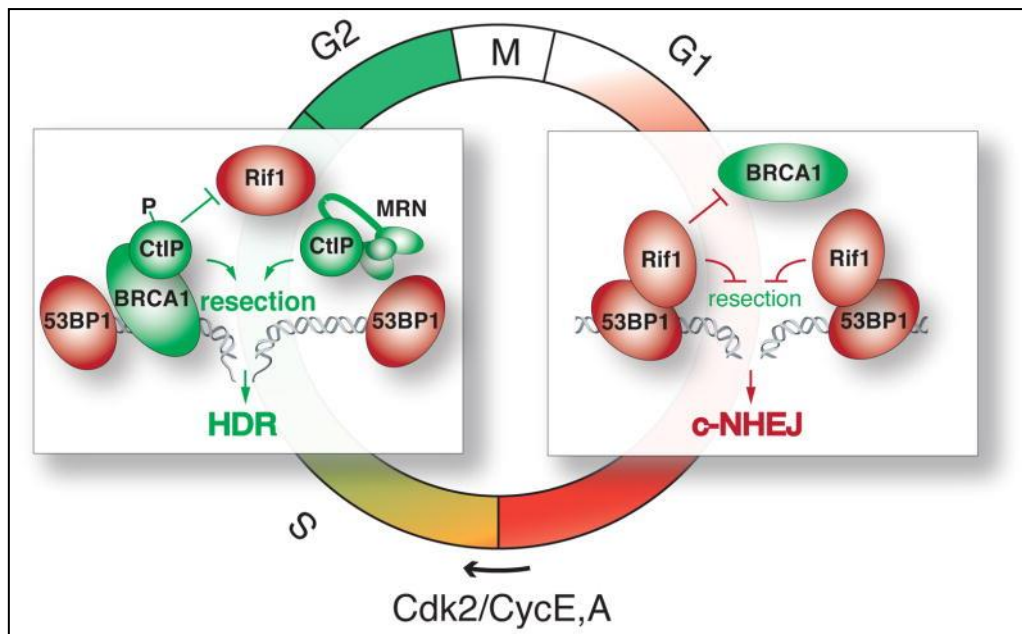
##### 4.2.1 La protéine 53BP1

Le mécanisme d'action principal de cette protéine est l'activation de la réparation des DSBs par NHEJ. La protéine 53BP1 interagit avec la chromatine au niveau des DSBs via deux MPTs dont la méthylation de la Lysine 20 de l'histone H4, H4K20me2 et l'ubiquitination de la Lysine 15 de l'histone H2A, H2AK15ub (Partie III sur les modifications d'histones) pour promouvoir la NHEJ (Amélie Fradet-Turcotte et al., 2013). Sa capacité à promouvoir la réparation par NHEJ est spécifique du contexte. En effet, 53BP1 promeut ce mécanisme de réparation lors de la recombinaison des gènes VDJ et dans les cellules déficientes pour la protéines BRCA1 (paragraphe suivant) entre autres. En phase S, 53BP1 est responsable de la formation d'aberrations chromosomiques dans les cellules déficientes pour BRCA1 via une altération dans la formation de foyers RAD51 lors de l'étape de résection (Chen et al., 1999). En phase G2, 53BP1 inhibe le recrutement de BRCA1 inhibant ainsi l'étape de résection.

##### 4.2.2 La protéine BRCA1

Chez l'homme, la déficience pour la protéine BRCA1 est associée à une instabilité génomique caractérisée par un défaut de la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue. La protéine BRCA1 est impliquée dans l'activation de l'étape de résection via la régulation de la protéine Rif1, partenaire de la protéine 53BP1 (Figure 23). En effet, en phase S, la protéine BRCA1 complexée avec la protéine CtiP va réguler négativement l'accumulation de la protéine Rif1

(Escribano-Díaz et al., 2013) induisant ainsi l'activation de la recombinaison homologue. Pour cela, la phosphorylation de CtIP par les protéines CDK est indispensable. Par contre, en phase G2, BRCA1 va promouvoir l'étape de résection en inhibant l'accumulation de la protéine Rif1 favorisant ainsi la réparation par NHEJ. Pour finir, dans les cellules déficientes pour la protéine BRCA1, la protéine Rif1 va être recrutée via la phosphorylation de 53BP1 (effectuée par ATM) et inhiber la recombinaison homologue en bloquant l'étape de résection par un mécanisme inconnu (Escribano-Díaz et al., 2013 ; Silverman et al., 2004).



**Figure 23 :** Représentation schématique des différents rôles de la protéine 53BP1 dans le choix de l'activation des mécanismes de réparation NHEJ et HR (Zimmermann et Lange, 2014)

### **III/ Rôle de la chromatine : un statut important au cours de la réparation de DSBs**

#### **1/ Qu'est-ce que la chromatine ?**

La chromatine est composée de protéines histones autour desquelles s'enroule la molécule d'ADN. L'unité fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome. Celui-ci est retrouvé sous la forme d'un octamère d'histones. Il est formé par l'association d'un tétramère central composé de deux groupements H3-H4 et de deux dimères H2A et H2B autour duquel s'enroule une chaîne d'ADN ayant la forme d'un collier de perles constitué de 147 paires de bases (Kornberg et Thomas, 1974). Entre chaque nucléosome, il existe un « linker » dont la taille peut varier entre 20 et 60 paires de bases afin de maintenir la structure générale. De plus à chaque extrémité de ce linker, se trouve l'histone H1 qui permet de renforcer la stabilité du nucléosome (Pour revue : Campos et Reinberg, 2009). La première fonction de la chromatine est de compacter la molécule d'ADN dans le plus petit volume possible pour qu'elle puisse tenir dans le noyau d'une cellule. Chez les mammifères, on retrouve la chromatine sous deux formes :

- L'hétérochromatine possédant une activité transcriptionnelle nulle du fait du fort degré de compaction de celle-ci, on parle de chromatine silencieuse. Elle est subdivisée en deux états, l'hétérochromatine facultative silencieuse que l'on retrouve principalement au niveau de région génique qui seront transcrites lors de situations précises telles que le développement embryonnaire par exemple, et l'hétérochromatine constitutive que l'on retrouve exclusivement au niveau de séquences répétées, des extrémités des télomères et dans les régions péricentriques.
- L'euchromatine possédant une activité transcriptionnelle active. Le degré de compaction de l'euchromatine est beaucoup plus faible que celui de l'hétérochromatine ainsi au niveau de celle-ci peuvent avoir lieu des mécanismes tels que la transcription ou encore la réparation de l'ADN.

En réponse aux dommages à l'ADN, la chromatine va être le siège de modifications en subissant un remodelage par différents mécanismes tels que les modifications

d'histones par le biais de MPTs mais également par l'intervention de « remodeleurs » chromatiniens qui sont dépendants de la molécule d'ATP.

## **2/ Rôle des histones dans le remodelage de la chromatine en présence de DSBs**

Les histones sont des protéines formées d'un domaine globulaire et d'une queue N-terminale non structurée située à l'extérieur du nucléosome. Les histones vont être affectées par des modifications post-traductionnelles au niveau de leur queue N-terminale.

### **2.1 Les différentes MPTs des histones**

Les histones vont être modifiées par différentes MPTs qui permettent de conférer une signature particulière et spécifique des différentes formes de la chromatine. En effet, au niveau de l'euchromatine ces différentes modifications d'histones vont permettre par exemple, l'accès aux protéines de réparation si la cellule détecte des DSBs ou encore permettre la transcription de gènes spécifiques. De même, ces MPTs vont créer un environnement propre et spécifique au niveau de l'hétérochromatine pour que celui-ci ne puisse pas permettre la transcription de gènes puisque celui-ci correspond à un état silencieux de la molécule d'ADN. Parmi ces différentes MPTs on retrouve principalement l'acétylation/déacétylation des Lysine, la méthylation/déméthylation des résidus Lysine et Arginine, la phosphorylation/déphosphorylation des Sérine/Thréonine et Tyrosine et l'ubiquitination /déubiquitination des Lysine (Table 3). Il existe également des MPTs moins connues car moins étudiées comme la GlcNacylation, la Citrullination qui consiste à la conversion d'une Arginine en acide Citrulline jouant un rôle au cours du développement embryonnaire et pour finir la proline isomérisation. Ces MPTs sont réalisées spécifiquement par différentes classes d'enzymes.

### **2.2 Les enzymes responsables des MPTs des protéines histones**

Tout d'abord, l'acétylation des histones est orchestrée par les histones acétyl transférases HATs et la déacétylation par les histones désacétylases HDAC (Sternier et Berger, 2000) (Table 3). Cette acétylation au niveau des protéines histones est



responsable de la relaxation de la chromatine, évènement nécessaire est indispensable pour la transcription mais aussi pour que la réparation des DSBs puisse avoir lieu.

Ensuite, la méthylation d'histones est à l'origine de plusieurs fonctions au niveau de la chromatine. Elle peut être observée sous la forme de mono, di ou tri méthylation et participer à divers mécanismes. Par exemple, celle-ci est associée à la répression transcriptionnelle au travers la tri-méthylation de la Lysine 9 de l'histone H3 retrouvée sous la marque H3K9me3 par contre au travers la tri-méthylation de la Lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) la méthylation est associée à une activation transcriptionnelle. De même, la méthylation des Arginine des histones H3 et H4 promeut l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes. Les enzymes responsables de cette MPT sont nombreuses et font partie de la famille des histones méthyl transférases et histones déméthylases (Zhang et Reinberg, 2001) (Table 3).

Ensuite, la phosphorylation des protéines histones est également importante dans le processus de compaction de la chromatine notamment lors de la division du cycle cellulaire via la phosphorylation de la Sérine 10 de l'histone H3 (pH3S10) (Nowak et Corces, 2004), dans la régulation transcriptionnelle et lors de la réparation des DSBs et plus précisément au niveau de la signalisation des DSBs, notamment par la phosphorylation de la Sérine 139 du variant de l'histone H2AX :  $\gamma$ H2AX. La phosphorylation est réalisée par l'action de différentes protéines kinases et la déphosphorylation par des phosphatases (Table 3).

Pour finir, l'ubiquitination des histones et en particulier l'ubiquitination de l'histone H2A et de son variant H2AX joue un rôle central dans la signalisation de la réponse aux DSBs. Cette MPT est réalisée par les enzymes E3 ubiquitines ligases (Table 3). Par exemple, en présence de DSBs, les E3 ligases telles que RNF8 et RNF20 vont être responsables de l'ubiquitination de la Lysine 120 de l'histone H2B, alors que la E3 ubiquitine ligase RING1A va ubiquitinyler la Lysine 119 de l'histone H2A.

Ces différentes MPTs vont réguler la structure de la chromatine par deux mécanismes distincts. Tout d'abord, elles vont jouer sur le degré de compaction de la chromatine par un mécanisme d'inhibition de contact entre les différents nucléosomes et ensuite ces MPTs vont permettre de recruter des protéines non histones impliquées dans

divers mécanismes tels que la transcription ou encore la réparation des dommages à l'ADN.

Enzymes impliquées	Histones modifiées	Enzymes impliquées	Histones modifiées
<b>Acétyltransférases</b>		<b>Lysine Déméthylases</b>	
HAT1	H4 (K5, K12)	LSD1/BHC110	H3K4
CBP/P300	H3 (K14, K18) H4 (K5, K8) H2A (K5) H2B (K12, K15)	JHDM1a	H3K36
PCAF/GCN5	H3 (K9, K14, K18)	JHDM1b	H3K36
TIP60	H4 (K5, K8, K12, K16) H3 K14	JHDM2a	H3K9
HB01 (ScESA1, SpMST1)	H4 (K5, K8, K12)	JHDM2b	H3K9
ScSAS3	H3 (K14, K23)	JMJD2A/JHDM3A	H3K9, H3K36
ScSAS2 (SpMST2)	H4 K16	JMJD2B	H3K9
ScRTT109	H3 K56	JMJD2C/GASC1	H3K9, H3K36
		JMJD2D	H3K9
<b>Déacétylases</b>		<b>Arginines Méthyltransférases</b>	
SirT2 (ScSir2)	H4 K16	CARM1	H3 (R2, R17, R26)
		PRMT4	H4R3
<b>Lysine Méthyltransférases</b>		PRMT5	H3R8, H4R3
SUV39H1	H3K9	<b>Sérine/Thréonine Kinases</b>	
SUV39H2	H3K9	Haspin	H3T3
G9a	H3K9	MSK1	H3S28
ESET/SETDB1	H3K9	MSK2	H3S28
EuHMTase/GLP	H3K9	CKII	H4S1
CLL8	H3K9	Mst1	H2BS14
SpClr4	H3K9	<b>E3 ubiquitine ligases</b>	
MLL1	H3K4	Bmi/Ring1A	H2AK119
MLL2	H3K4	RNF20/RNF40	H2BK120
MLL3	H3K4		
MLL4	H3K4		
MLL5	H3K4		
SET1A	H3K4		
SET1B	H3K4		
ASH1	H3K4		
Sc/Sp SET1	H3K4		
SET2 (Sc/Sp SET2)	H3K36		
NSD1	H3K36		
SYMD2	H3K36		
DOT1	H3K79		
Sc/Sp DOT1	H3K79		
Pr-SET 7/8	H4K20		
SUV4 20H1	H4K20		
SUV420H2	H4K20		
SpSet 9	H4K20		
EZH2	H3K27		
RIZ1	H3K9		

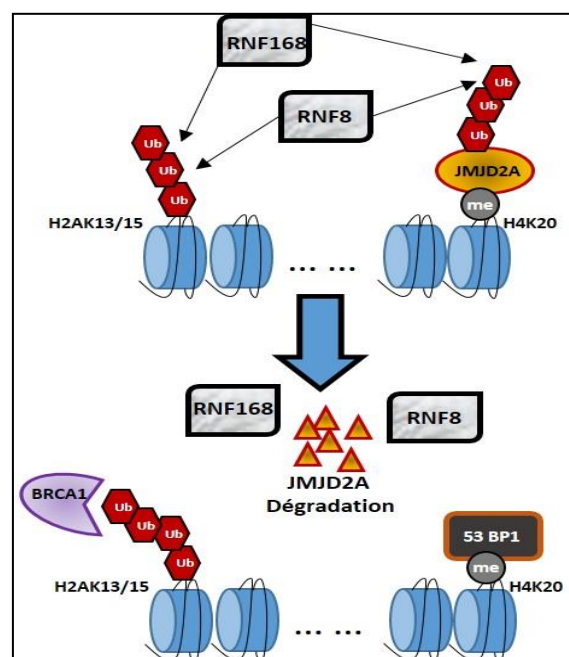
**Table 3 : Classification des principales enzymes responsables des modifications post-traductionnelles des protéines histones (d'après Kouzarides, 2007)**

A l'heure actuelle, l'existence d'un dialogue entre ces différentes MPTs a été démontré. En effet, ce dialogue peut exister au sein d'une même protéine histone (dialogue en cis), entre deux histones au sein du même nucléosome (dialogue en trans) et au travers de différents nucléosomes.

### 2.3 Quelques exemples de MPTs des histones ayant un rôle dans la réparation de DSBs

► MPTs au niveau de l'histone H4 : les données de la littérature permettent de distinguer 3 protéines associées à l'histone H4. On distingue les méthylases L3MBTL1 (Lethal(3)malignant brain tumor-like protein) (Acs et al., 2011) et JMJD2A (Jumonji domain 2A)(Mallette et al., 2012) et la protéine ZMYND8 [Zinc Finger MYND (myeloid, Nervy, and DEAF-1) domain Containing 8].

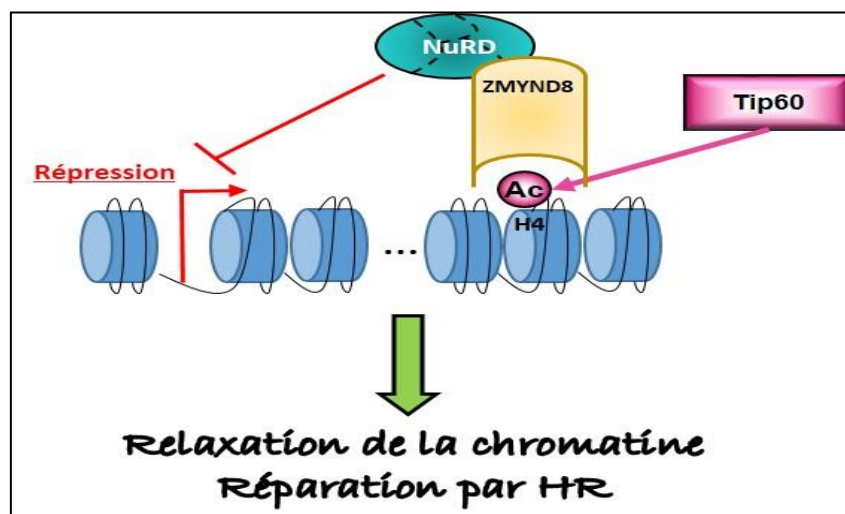
Pour pouvoir décrire l'action de ces différentes protéines, prenons l'exemple de la protéine 53BP1. Comme décrit précédemment, la protéine 53BP1 est importante dans la réparation par NHEJ. En effet, de nombreuses études démontrent que celle-ci est recrutée au niveau des DSBs via la méthylation de la Lysine 20 de l'histone H4 orchestrée par la méthylase L3MBTL1 (Botuyan et al., 2006). D'autre part, le recrutement de 53BP1 est également régulé par la dégradation de la protéine JMJD2A qui en absence de dommages à l'ADN est fixée au niveau de la marque H4K20me. En effet, en présence de DSBs, les E3 ubiquitines ligases RNF8 et RNF168 vont ubiquitinyler JMJD2A permettant son « décrochage » de la marque H4K20me et sa dégradation ce qui facilite le recrutement de la protéine 53BP1 (Figure 24) (Mallette et al., 2012).



**Figure 24 : Représentation schématique du recrutement des protéines 53BP1 et BRCA1 via les modifications post traductionnelles de l'histone H4**

En ce qui concerne la protéine ZMYND8, en présence de DSBs, celle-ci recrute le complexe répresseur NuRD (Nucleosome and Remodeling deacetylase) au niveau des DSBs pour permettre la réparation des dommages soit par NHEJ soit par HR. En effet, le complexe NuRD va désacétyler la Lysine 16 de l'histone H4 ce qui favorisera le recrutement de la protéine 53BP1 et ainsi la réparation par NHEJ (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015). De même, une étude a montré le rôle de ces deux protéines dans la réparation par recombinaison homologue grâce à l'activité de répresseur transcriptionnel du complexe NuRD (Gong et al., 2015). En effet dans cette étude, les auteurs montrent que ZMYND8 est recrutée au niveau de l'acétylation de l'histone H4 permettant le recrutement du complexe NuRD qui inhibera la transcription de gènes cibles favorisant ainsi la recombinaison homologue (Figure 25).

La phosphorylation est également retrouvée au niveau de l'histone H4 en réponse aux DSBs. En effet, en 2005 une étude effectuée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a montré que la protéine kinase CK2 (casein kinase II) phosphorylait la Sérine 1 de l'histone H4 ce qui permettrait de réparer les dommages par NHEJ bien que ceci n'ait pas été formellement prouvé (Cheung et al., 2005).



**Figure 25 : Représentation schématique du recrutement et du rôle de la protéine ZMYND8 en présence de DSBs**

► MPTs au niveau de l'histone H2A : Une étude publiée en 2000 a démontré chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qu'en présence de DSBs, la Sérine 129 de l'histone H2AX était phosphorylée par la protéine kinase Mec1 et que cette phosphorylation était importante pour la réparation par NHEJ (Downs et al., 2000).

De plus, suite à l'induction de DSBs par des rayons ultraviolets, l'ubiquitine ligase Ring2 va ubiquitinyler l'histone H2A d'une manière dépendante de la kinase ATR démontrant ainsi un rôle de cette MPT dans la réponse aux dommages à l'ADN (Bergink et al., 2006).

Deux autres ubiquitines ligases sont également impliquées dans la réparation des DSBs. Il s'agit de l'ubiquitine E3 ligase RNF8 et de l'ubiquitine E3 ligase RNF168. RNF8 va jouer un rôle en collaborant avec la protéine MDC1. En effet, RNF8 va être recrutée par la forme phosphorylée (par la kinase ATM) de la protéine MDC1 au niveau des DSBs permettant ainsi l'ubiquitination de l'histone H2A. Cette forme ubiquitinylée au niveau de l'histone H2A et  $\gamma$ H2AX va se propager au niveau des DSBs et permettre l'amplification du signal qui sera à l'origine du recrutement de protéines de réparation telles que BRCA1 et 53BP1 (Mailand et al., 2007; Doil et al., 2009). La protéine 53BP1 peut également être recrutée par l'intermédiaire de l'ubiquitination des Lysine 13 et 15 de l'histone H2A effectuée par RNF168.

### **3/ Le dynamisme des nucléosomes en présence de dommages à l'ADN**

L'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN nécessite un environnement chromatinien particulier et demande de grands changements au niveau de la structure de la chromatine afin de permettre le recrutement des acteurs impliqués dans les différents mécanismes de réparation des cassures double brin. Notamment, lors de la réparation par recombinaison homologue, l'étape de résection 5' vers 3' requiert un remodelage de la chromatine pour permettre la formation d'un ADN simple brin afin de recruter la protéine RAD 51. Il en est de même pour l'étape d'invasion de l'ADN simple brin au niveau de la chromatide sœur homologue. Le remodelage de la chromatine met en jeu de nombreux complexes multi-protéiques ayant la caractéristique commune d'être dépendant de la molécule d'ATP, on les nomme les « remodeleurs » de la chromatine.

#### **3.1 Les différents complexes « remodeleurs » de la chromatine**

Ces complexes sont classés en quatre principales familles basées sur l'homologie de séquence et par la présence d'une sous unité ATPasique hautement conservée. Ces familles appartiennent toutes à la « super famille » SF2 (« superfamily

Il helicase-related proteins ») qui utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour assurer le remodelage de la chromatine. Il s'agit de la famille SWI/SNF (switching defective/sucrose nonfermenting), ISWI (imitation switch), CHD (chromodomain helicase DNA binding) et la famille INO80 (inositol requiring 80) (Table 4).

Familles	Sous unité catalytique	Complexes (autres membres du complexe)	Rôle au niveau de la chromatine
<b>SWI/SNF</b> (Reconnaissance et fixation des protéines histones acétylées)	Brg1 hBRM	BAF PBAF BAF	Réorganisation de la chromatine pour promouvoir la fixation de facteurs de transcription
<b>ISWI</b>	SNF2H	CHRAC ACF WICH (WSTF)	Réorganisation de la chromatine pour promouvoir la répression de la transcription
<b>CHD</b> (présence d'un chromodomaine)	CHD3 CHD4	NuRD (HDAC1/HDAC2/RbAp46/RbAp48/MTA1/MBD3)	Réorganisation de la chromatine par la déacétylation des protéines histones
<b>INO80</b>	INO80 p400 SMARCAD1	INO80 NuA4/Tip60 Non connu	Réorganisation de la chromatine par l'acétylation des protéines histones et par l'incorporation de variant H2AZ

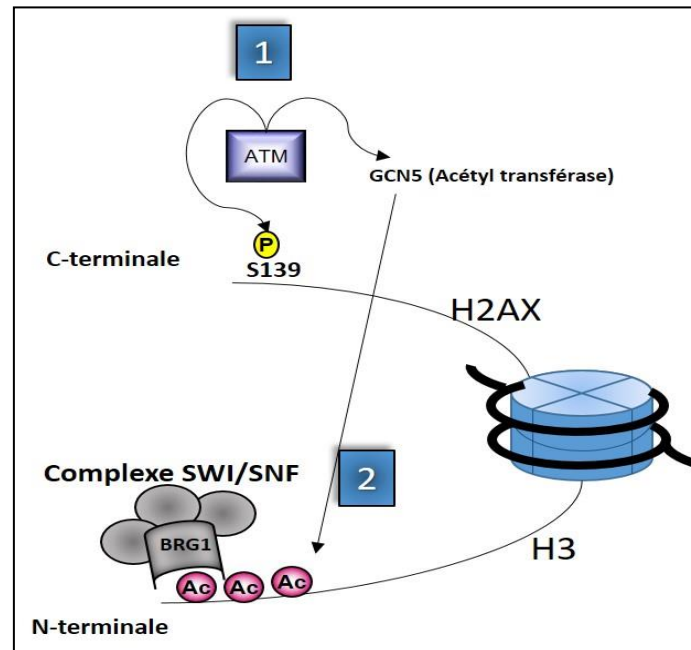
**Table 4 :** Simplification de la classification des différentes familles des remodeleurs de la chromatine impliquée dans la réponse des DSBs (adapté de Jeggo et Downs, 2014)

Ces différents complexes vont permettre le remodelage de la chromatine afin de passer d'un état condensé à un état relaxé de la chromatine assurant ainsi le bon déroulement de la DDR.

### 3.2 Rôles principaux des complexes remodeleurs de la chromatine

**La famille SWI/SNF :** les protéines appartenant à cette famille possèdent des caractéristiques communes dont la présence d'un domaine ATPasique très conservé et un bromodomaine au niveau de leur région C-terminale ayant la capacité de reconnaître les Lysine acétylées. Les données de la littérature montrent clairement l'implication de cette famille dans le remodelage de la chromatine en réponse aux DSBs dans les deux principaux mécanismes de réparation NHEJ (Park et al., 2006 ; Ogiwara et al., 2011) ou HR (Chai et al., 2005). Une autre étude a montré que la sous unité catalytique BRG1 coopérait avec  $\gamma$ H2AX et l'histone H3 au sein du même nucléosome en réponse aux DSBs (Lee et al., 2010). En effet, les auteurs montrent

que BRG1 se fixe au niveau de la marque  $\gamma$ H2AX et que cette interaction est dépendante de l'acétylation de l'histone H3 sein du même nucléosome (Figure 26).



**Figure 26** : Remodelage de la chromatine via la coopération de la protéine BRG1, la phosphorylation de l'histone H2AX et l'acétylation de l'histone H3 (d'après Lee et al., 2010)

**La famille ISWI** : la sous unité catalytique de cette famille SNF2H est impliquée dans la réparation des DSBs par NHEJ. Celle-ci fait partie de plusieurs complexes et notamment le complexe ACF (Table 3). Au cours de la réparation par NHEJ, une étude a montré que le complexe ACF interagissait avec la protéine Ku et que la déplétion de SNF2H ou de ACF menait à une altération de la réparation résultant de la diminution de l'interaction avec la protéine Ku et son recrutement au niveau des DSBs suggérant ainsi un rôle de SNF2H dans le recrutement de la protéine Ku (Lan et al., 2010).

**La famille CHD** : cette famille est caractérisée par un chromodomaine au niveau N-terminal et possède une activité catalytique ATPasique « SNF2-like » assurée par les protéine CHD3 et CHD4 deux composants du complexe répresseur NuRD. Plusieurs études ont montré l'implication de la protéine CHD4 dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, celle-ci régule la transition G1/S au cours de la réparation des DSBs. Pour cela, CHD4 va déacétyler la protéine P53 provoquant son activation. Ainsi P53 pourra induire l'activation de p21 et activer le point de contrôle G1/S pour stopper la progression du cycle cellulaire afin de réparer les dommages induits (Polo et al., 2010).



De plus, CHD4 va stimuler l'activité enzymatique des E3 ligases RNF8 et RNF168 pour permettre le recrutement de BRCA1 par ubiquitination au niveau des DSBs. Dans cette même étude, les auteurs montrent que CHD4 avec la coopération de MTA2 un autre membre du complexe NuRD participe à l'activation du point de contrôle G2/M (Smeenk et al., 2010).

Une autre étude en 2011 montre l'importance de la phosphorylation de CHD4 par la protéine kinase ATM dans le recrutement du complexe NuRD suite à l'induction de DSBs par radiations ionisantes puisque des mutations au niveau de ce site de phosphorylation abolissent le recrutement du complexe NuRD aux niveaux des DSBs provoquant ainsi un défaut de réparation des dommages à l'ADN (Urquhart et al., 2011).

**La famille INO80** : Ce complexe possède divers rôles au niveau de la chromatine. En effet, cette famille joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle, la réplication de l'ADN mais également dans la réparation des dommages à l'ADN. Seul ce dernier point sera abordé ici. Au sein de cette famille on retrouve principalement 2 complexes possédant chacun sa propre sous unité catalytique. Ainsi on distingue le complexe INO80 du complexe NuA4/Tip60 ayant comme sous unité catalytique INO80 et p400 respectivement (Table 3).

► INO80 : avec la coopération de la protéine SMARCAD1 faisant également partie de cette famille, INO80 facilite l'étape de résection de l'ADN (Gospodinov et al., 2011) et facilite la recombinaison homologue comme l'ont montré des essais comètes (Gospodinov et al., 2011).

► NuA4/Tip60 : lors de la réponse aux DSBs, un mécanisme d'échange d'histones est observé au sein de la chromatine favorisant la relaxation de la chromatine. Ce mécanisme consiste à l'échange du dimère H2A/H2B en dimère H2AZ/H2B réalisé par la protéine p400 suivi de l'acétylation de l'histone H4 par l'acétyl transférase Tip60 (Xu et al., 2010). De manière plus précise, l'incorporation du variant H2AZ est transitoire. En effet, l'accumulation de H2AZ va créer un environnement propice au niveau du nucléosome et va permettre le recrutement d'une protéine chaperonne nommée ANP32E qui va induire le retrait de H2AZ libérant la queue de l'histone H4. Celle-ci sera alors accessible et sera acétylée par Tip60 promouvant ainsi la relaxation de la chromatine (Gursoy-Yuzugullu, et al., 2015).



Une revue sur l'histone H2AZ explique comment celle-ci permet le remodelage de la chromatine via l'acétylation des histones et l'ubiquitination de la chromatine pour favoriser le recrutement de BRCA1 et 53BP1 au niveau des DSBs.

#### **4/ Le cas particulier de la réparation des DSBs au niveau de l'hétérochromatine**

L'hétérochromatine constitue une véritable barrière à la réparation des DSBs du fait de son degré de compaction. Cette barrière est à l'origine d'une instabilité génomique importante lorsque les DSBs ne sont pas réparées. C'est pourquoi la cellule a mis en place une régulation fine de la réparation des DSBs situées au niveau de l'hétérochromatine par différents mécanismes impliquant des remodeleurs de la chromatine mais également des protéines de réparation telles que la kinase ATM et l'acétyl transférase Tip60.

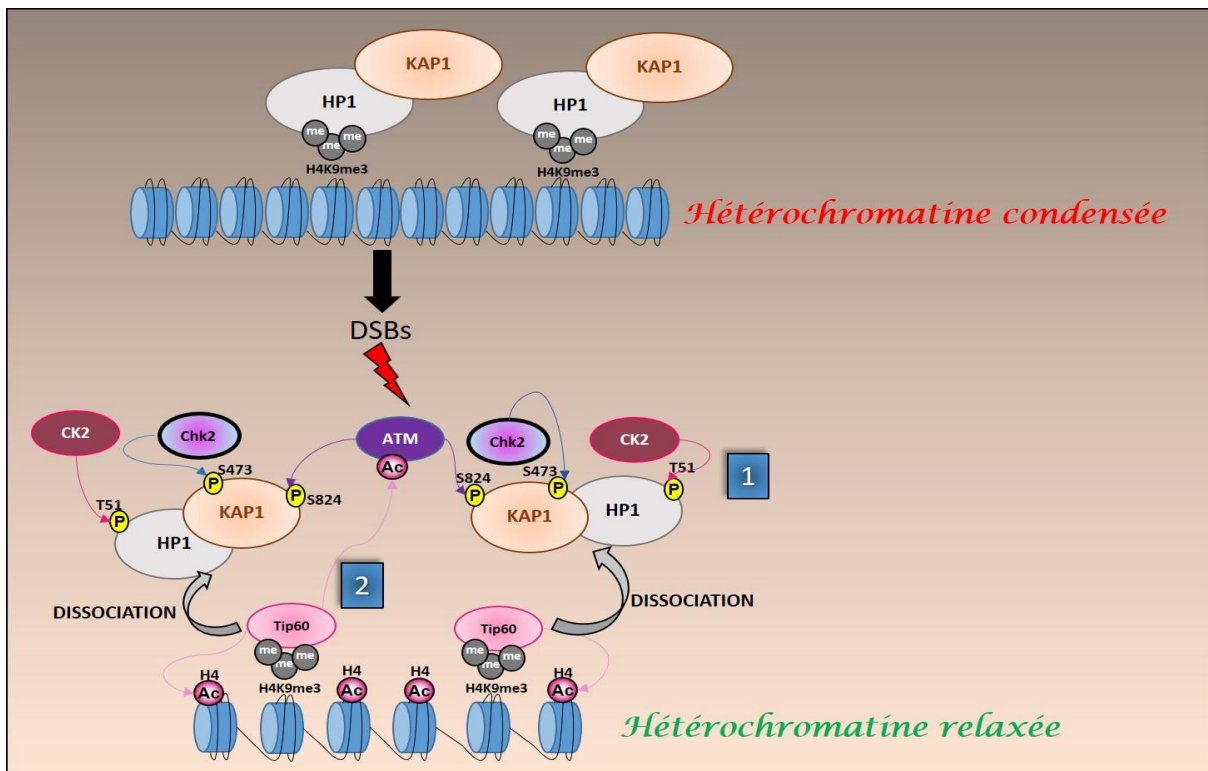
La réparation des cassures double brin situées au niveau de l'hétérochromatine évolue avec une cinétique beaucoup plus lente que celle de la réparation des DSBs situées au niveau de l'euchromatine du fait de la différence de compaction de la chromatine. En effet, la présence de cassures double brin au niveau de l'hétérochromatine va provoquer un remodelage de la chromatine différent de celui que l'on peut observer au niveau de l'euchromatine nécessitant le recrutement de protéines spécifiques et notamment la protéine KAP1 (KRAB [KRüppel Associated Box] domain Associated Protein 1). Ainsi, en fonction de ces différentes interactions, la protéine KAP1 va permettre la relaxation de la chromatine pour faciliter l'accès aux protéines de réparation au niveau des DSBs (Cann et Dellaire, 2011 ; Gursoy-Yuzugullu et al., 2015 ; Goodarzi et Jeggo, 2012).

##### **4.1 La protéine KAP1 va faciliter la relaxation de la chromatine via la protéine HP1 et l'acétyl transférase Tip60 (Figure 27)**

La protéine HP1 permet le maintien de la structure de l'hétérochromatine au niveau des centromères et des télomères en se fixant sur la forme tri-méthylée de la Lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) déposée par la protéine SUV39H (Dinant et Luijsterburg, 2009). Il existe trois isoformes de la protéine HP1 : HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  et HP1 $\gamma$ . Suite à l'induction de DSBs par irradiation, la protéine HP1 va se dissocier de la chromatine. Cette dissociation est permise par l'intermédiaire de deux événements.

Tout d'abord, la protéine KAP1 va être phosphorylée sur la Sérine 473 par la protéine kinase CHK2, cette phosphorylation va permettre l'interaction avec la protéine HP1 provoquant la dissociation de HP1 de la chromatine. Cette phosphorylation est indispensable pour la relaxation de la chromatine (Chang et al., 2008 ; White et al., 2016). Le second évènement est la phosphorylation de la protéine HP1 par la protéine kinase CK2 au niveau de la Thréonine 51 pour promouvoir également sa dissociation de la chromatine (Ayoub et al., 2009).

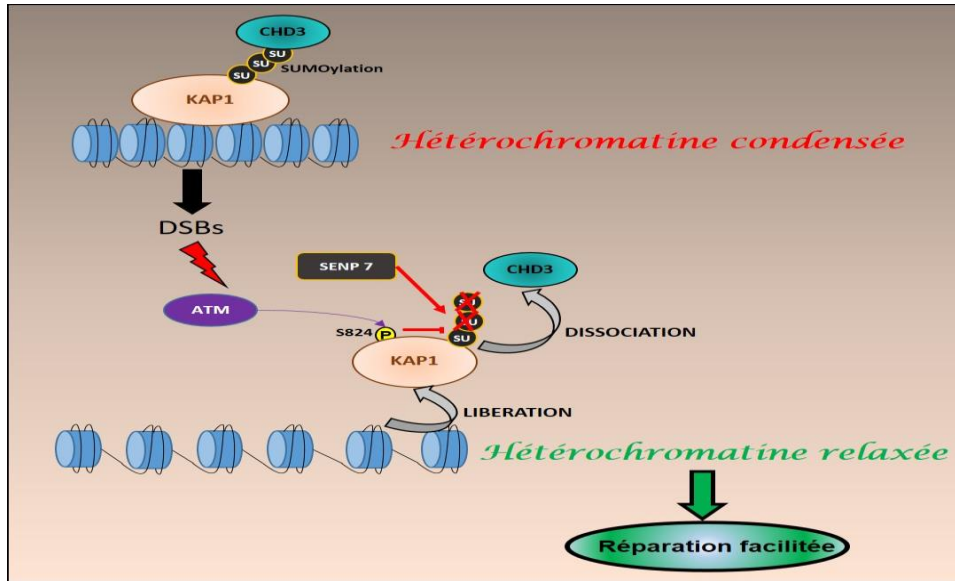
La protéine Tip60 va également jouer un rôle dans la relaxation de la chromatine. En effet, celle-ci va venir se fixer au niveau de la marque H3K9me3 après la dissociation de la protéine HP1 (Sun et al., 2009). Cette fixation va induire l'activation de son activité enzymatique et permettre ainsi l'activation de la kinase ATM par acétylation (Sun et al., 2007) et la décondensation de l'hétérochromatine via l'hyper-acétylation de l'histone H4.



**Figure 27 :** Représentation schématique de la relaxation de la chromatine médiée par les protéines KAP1, HP1 et Tip60

#### 4.2 La protéine KAP1 va promouvoir la relaxation de la chromatine en se dissociant de la protéine CHD3 (Figure 28)

La région C-terminale de la protéine KAP1 est SUMOylée sur de nombreuses Lysine (Ivanov et al., 2007). La SUMOylation de ces différentes Lysine est connue pour permettre l'interaction avec la sous-unité CHD3 du complexe NuRD au niveau de l'hétérochromatine, ce qui aboutit à la répression transcriptionnelle et au maintien de la forme condensée de la chromatine inhibant ainsi sa relaxation (Ivanov et al., 2007). En présence de DSBs, la kinase ATM va phosphoryler la protéine KAP1 au niveau de la Sérine 824 (Ziv et al., 2006 ; Goodarzi et al., 2008). La sous unité de la kinase DNA-PKcs peut également phosphoryler la protéine KAP1 pour promouvoir la relaxation de la chromatine (White et al., 2006). Cette phosphorylation va perturber l'interaction de la protéine KAP1 SUMOylée avec la protéine CHD3. En effet, la forme phosphorylée de la protéine KAP1 va libérer la protéine CHD3 de l'hétérochromatine (Goodarzi et al., 2011). Ainsi, l'effet inhibiteur de la décondensation de la chromatine médié par le complexe NuRD sera levé et induira la relaxation de la chromatine. La phosphorylation de la protéine KAP1 n'est pas la seule MPT à réguler la libération de CHD3. En effet, la régulation de la SUMOylation de la protéine KAP1 par la dé-SUMOylase SENP7 va être également impliquée dans ce processus lors de la réponse aux DSBs pour promouvoir la relaxation de la chromatine (Garvin et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs démontrent que la protéine SENP7 dé-SUMOyle la protéine KAP1 pour induire la dissociation de la protéine CHD3 de KAP1. De plus, la relaxation de la chromatine est un mécanisme réversible. En effet, les protéines phosphatases PP1 alpha et PP1 bêta vont restaurer le degré de compaction de la chromatine en dé-phosphorylant la protéine KAP1 et en stimulant sa SUMOylation, permettant ainsi le recrutement du complexe NuRD via la protéine CHD3 (Li et al., 2010).



**Figure 28 :** Représentation schématique de la relaxation de la chromatine par l'intermédiaire de la dissociation de la protéine CHD3 et de KAP1

## **IV/ Les dérégulations des différentes voies de réparation de l'ADN (HR ou NHEJ) conduisent à l'instabilité génomique et au développement de cancers**

En présence de dommages à l'ADN, la cellule met en place un réseau complexe de voies de signalisation pour permettent la réparation des dommages à l'ADN (DDR). De plus, si la cellule détecte trop de dommages, celle-ci va induire la mort cellulaire des cellules endommagées par apoptose par l'activation de la protéine P53 (Matt et Hofmann, 2016). Tous ces mécanismes vont permettre la maintenance de la stabilité génomique afin d'empêcher la tumorigénèse. Si les dommages ne sont pas réparés, cela peut conduire à l'apparition de nombreuses mutations mais aussi conduire à la formation d'aberrations chromosomique telles que des délétions ou des insertions qui seront à l'origine de l'instabilité génomique, et donc de la transformation cellulaire et du développement de nombreux cancers. Dans la mesure où le nombre de lésions de l'ADN est considérable (200000 lésions par cellule et par jour), il n'est pas surprenant que la dérégulation des mécanismes de réparation soit à l'origine de l'apparition de certains cancers. En effet, le cancer est lié à un défaut d'activation de la mort cellulaire des cellules ayant accumulé trop de dommages et à la survie de ces cellules qui présentent une instabilité génomique importante. Les dérégulations d'expression observées pour les principaux régulateurs de la réponse aux dommages à l'ADN et notamment au niveau des protéines P53, ATM, MRE11, NBS1 ou encore DNA-PK sont la cause de nombreuses pathologies humaines.

### **1/ Mutations des gènes impliqués dans la réparation des DSBs observées dans les pathologies cancéreuses**

#### **1.1 Mutations des gènes impliqués dans la recombinaison homologue**

La perte de fonction de la protéine kinase ATM est associée à la pathologie héréditaire AT (*Ataxia Telangiectasia*), un désordre neurologique.

La protéine clé de la recombinaison homologue, ATM est aussi sujette à des dysfonctionnements dans de nombreux cancers, cependant alors que les deux allèles

d'ATM sont mutés dans le cas de l'ataxie télangiectasie, une étude sur le cancer du sein effectuée chez 507 patientes a montré que 47 patientes possédaient une forme mutée d'ATM sur un seul allèle en association avec de nombreux autres gènes mutés (Koboldt et al., 2012). Une autre étude sur le colon a montré que dans 7% des cancers colorectaux, la protéine ATM était dérégulée par des mutations non-sens conduisant à la formation de protéines tronquées non fonctionnelles (Muzny et al., 2012). De même, des mutations au niveau des kinases de la famille PIKK sont retrouvées chez les patients atteints d'un cancer du poumon. En effet, une étude réalisée sur 178 tumeurs du poumon a montré que dans 96% des cas, au moins une mutation était retrouvée et que dans 42% des cas les mutations étaient situées au niveau du domaine kinase (Hammerman et al., 2012). Des mutations du gène codant la protéine ATM ont également été retrouvées dans des lymphomes (Beà et al. 2013). Il existe également des prédispositions génétiques qui augmentent les risques de développer certains cancers. C'est le cas notamment du cancer du sein et de l'ovaire. En effet, des mutations germinales au niveau des gènes codant les protéines BRCA1 et BRCA2 sont retrouvées dans ces cancers (Van Der Kolk et al., 2010). De même, des mutations au niveau du gène codant la protéine Rad51 sont associées à la prédisposition pour ces cancers (Walsh et al., 2011).

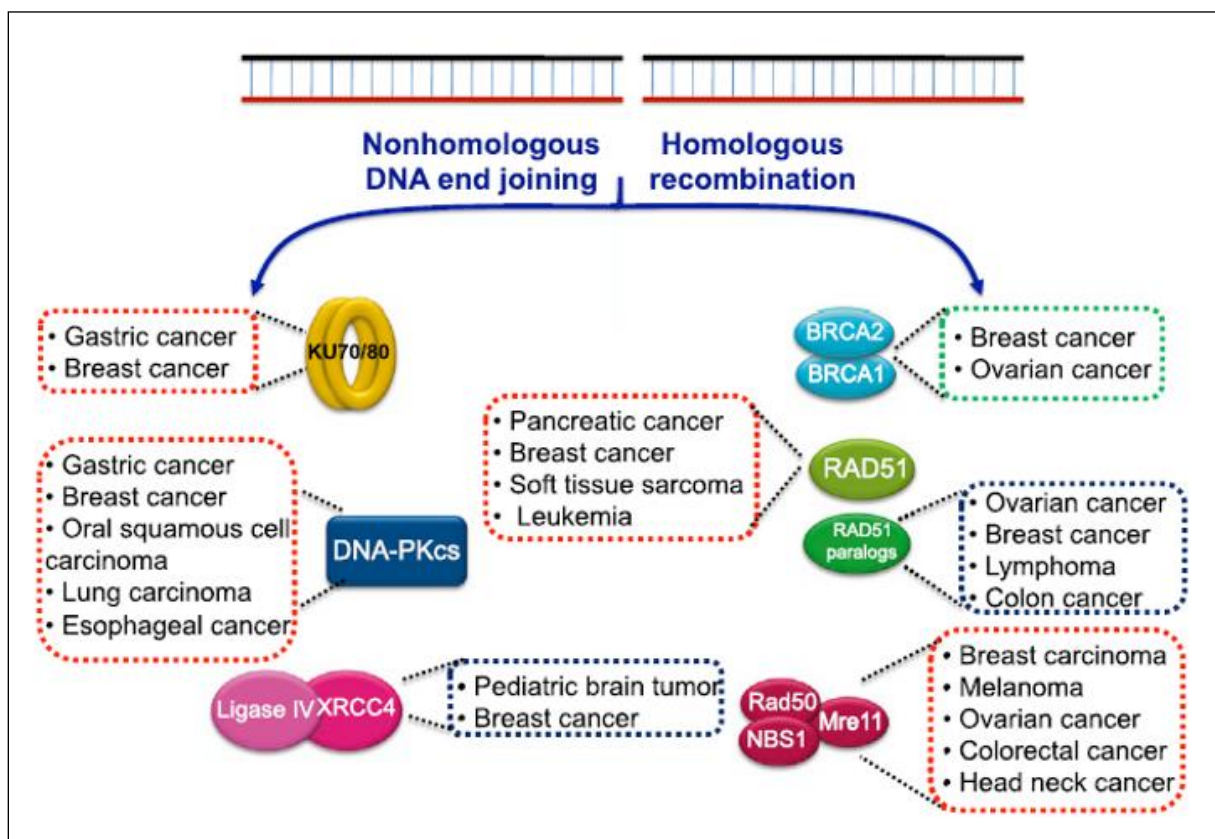
Des niveaux d'expression anormalement élevés de cette protéine (Rad51) sont retrouvées dans d'autres cancers tels que le cancer du pancréas, dans des leucémies mais également dans les sarcomes des tissus mous (Hannay et al., 2007).

Pour terminer, des mutations au niveau des gènes codants les protéines du complexe MRN et plus particulièrement la protéine NBS1, sont retrouvées dans le cancer du sein, dans des mélanomes et dans des cancers colorectaux (Steffen et al., 2004) (Figure 29).

## 1.2 Dérégulations des gènes impliqués dans la réparation par ligation des extrémités NHEJ

La protéine clé de la NHEJ, la kinase DNA-PK est sujette à des dysfonctionnements dans de nombreux cancers. Par exemple, une augmentation de l'expression de la kinase DNA-PK est associée au carcinome de la cavité orale (Shintani et al., 2003), au cancer des cervicales (Beskow et al. 2009) ou encore au cancer du poumon (Sirzen et al., 1999).

Des dérégulations des protéines KU70/KU80, DNAPKcs, de la Ligase IV et de la protéine XRCC4 jouent également un rôle dans la tumorigénèse puisqu'elles augmentent les risques de développer un cancer du sein (Fu et al., 2003) (Figure 29). De plus chez les patients atteints de gliomes, l'activité kinase de la DNAPK est augmentée considérablement, en étroite corrélation avec le grade de la tumeur. Des mutations au niveau du gène codant pour la protéine DNAPK sont également impliquées dans différents cancers dont le cancer de la vessie et le carcinome hépatocellulaire (Hsu et al., 2012).



**Figure 29 :** Association des dérégulations des protéines impliquées dans la NHEJ ou HR à de nombreux cancers (Srivastava et Raghavan, 2015)

## 2/ Principaux traitements anti-cancéreux ciblant la DDR

Les mécanismes de réparation de l'ADN représentent un intérêt pharmaceutique important puisque leur inhibition conduit à une sensibilisation accrue des cellules tumorales aux rayonnements ionisants et aux agents chimio-thérapeutiques. Le but de

la radiothérapie et de la chimiothérapie est d'induire une multitude de dommages à l'ADN qui ne seront pas réparés pour induire la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses. Cependant, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes de résistance à ces différents traitements en sur-activant la signalisation des dommages à l'ADN et en accumulant de nombreuses mutations au niveau des gènes codant pour les principaux acteurs de la DDR.

### 2.1 La chimiothérapie en 1<sup>ère</sup> ligne de traitement

La chimiothérapie est un traitement comportant l'administration d'agents chimiques qui agissent sur les cellules cancéreuses, soit en les détruisant, soit en inhibant leur prolifération. On retrouve différents agents chimiques tels que l'Etoposide, la Bléomycine, le Cisplatine, la camptothécine ou encore la doxorubicine.

L'Etoposide et la doxorubicine sont des inhibiteurs de la Topoisomérase II qui vont induire des DSBs. La camptothécine agit comme poison de la topoisomérase I. Elle se fixe au niveau de l'ADN empêchant ainsi la réplication en créant des lésions irréparables de l'ADN. La bléomycine est un antibiotique cytotoxique produit par une souche de *Streptomyces verticillus*. Son mécanisme d'action est similaire aux autres agents chimiques. Il agit essentiellement par atteinte directe de l'ADN sous forme de cassure simple ou double brin. Le cisplatine se fixe sélectivement sur l'ADN via des liaisons fortes et induit un changement de conformation de la double hélice de l'ADN. Ce changement de conformation inhibe la réplication et la transcription de l'ADN induisant ainsi la mort cellulaire.

Cependant la chimiothérapie est source d'effets secondaires non désirables chez de nombreux patients. Par exemple, la Doxorubicine est néphrotoxique, neurotoxique et cardiotoxique (Zhang et al., 2012). Ces différents traitements seuls ne sont pas toujours suffisants pour éradiquer totalement les cellules cancéreuses puisque celles-ci peuvent devenir chimiorésistantes. Ainsi, la recherche fondamentale sur les modes de fonctionnement des différentes voies de signalisation de la réparation des DSBs est indispensable à l'élaboration de nouveaux traitements anti-cancéreux. Au cours de ces dernières années, la recherche fondamentale a permis de développer de nouveaux traitements ciblant spécifiquement les acteurs principaux de la réparation des dommages à l'ADN, les kinases ATM et DNA-PKcs.



## 2.2 Les différents inhibiteurs des kinases de la famille PIKK

Cette stratégie de traitement est remarquablement efficace en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie.

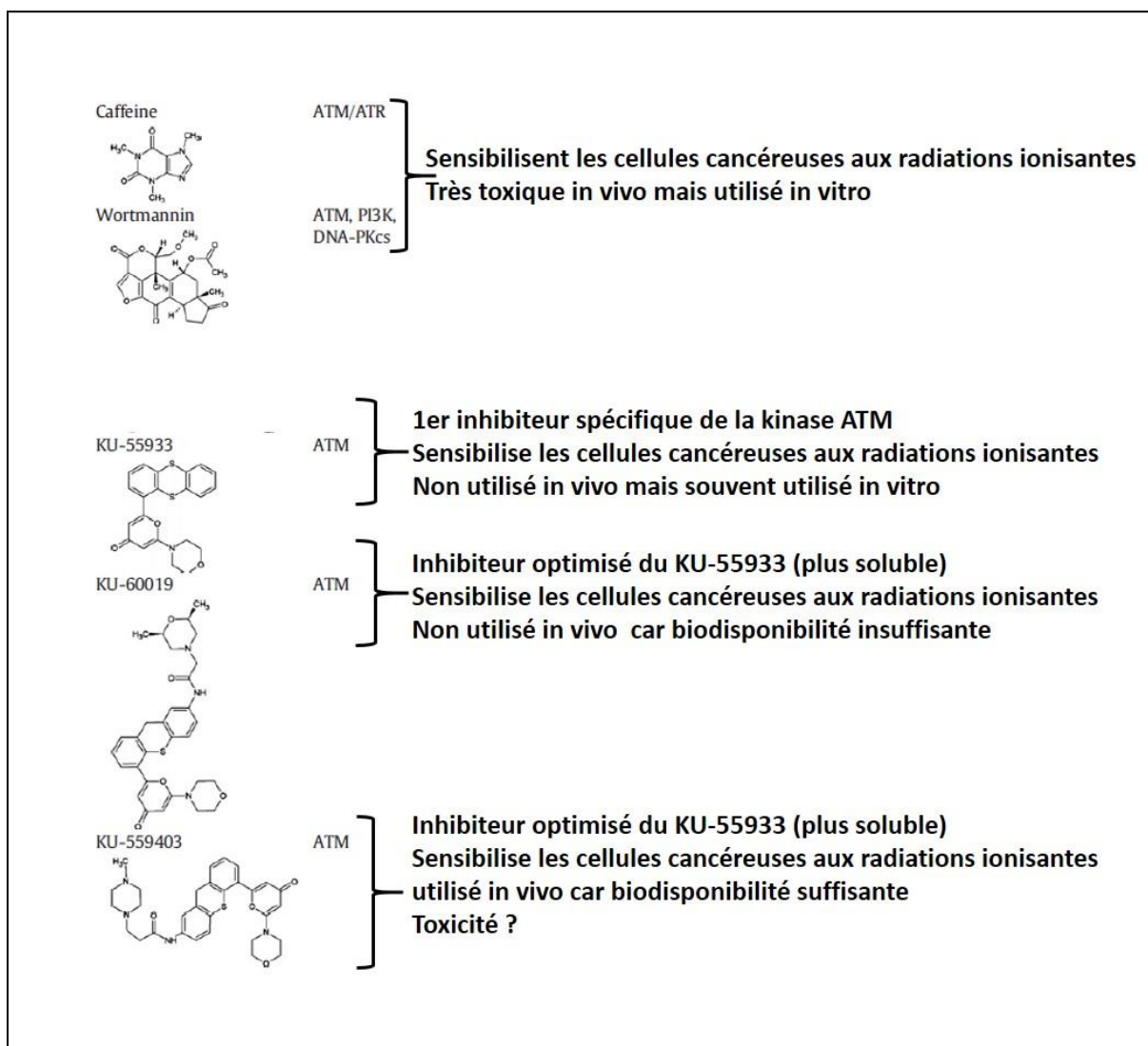
### 2.2.1 Inhibiteur de la kinase ATM

Les différents inhibiteurs de la protéine kinase ATM sont regroupés dans la table n°5.

En ce qui concerne le KU55933, celui-ci a été identifié et caractérisé par Hickson et al., en 2004. Dans cette étude les auteurs montrent que les cellules traitées avec le KU-55933 sont sensibilisées aux radiations ionisantes et aux cassures double brin induites par l'Etoposide, la Doxorubicine ou encore la camptothécine. Ils montrent également que la présence de cet inhibiteur ne bloque pas le cycle cellulaire en présence de DSBs. De plus, la spécificité de cet inhibiteur est démontrée puisque les cellules « AT » ayant un dysfonctionnement de la protéine kinase ATM ne montrent pas de sensibilité aux radiations ionisantes ni une quelconque incidence au niveau des checkpoints du cycle cellulaire en présence de DSBs (Hickson et al., 2004).

L'inhibiteur KU-60019 est quant à lui une forme optimisée du KU-55933 (plus soluble), cependant sa biodisponibilité est faible. L'équipe de Biddlestone-Thorpe et al., a montré que l'injection de cet inhibiteur directement dans les xénogreffes de gliome chez la souris se traduisait par une augmentation du temps de survie par rapport aux souris n'ayant pas reçu le traitement. De plus, les gliomes possédant une forme mutée de la protéine P53 sont beaucoup plus sensibilisés aux radiations ionisantes par rapport aux gliomes ayant la protéine P53 sauvage. Ainsi, KU-60019 pourrait être un bon adjuvant à la radiothérapie chez les patients atteints de tumeurs du cerveau avec la protéine P53 mutée (Biddlestone-Thorpe et al., 2013).

Le KU-559403 est le premier inhibiteur puissant et sélectif de la kinase ATM avec assez bonne solubilité et la biodisponibilité pour permettre les études *in vivo*. Cet inhibiteur confère une radiosensibilité *in vitro* considérablement augmentée de l'activité anti-tumorale de l'Etoposide dans des modèles de xénogreffes (Batey et al., 2013).



**Table 5 : Liste des principaux inhibiteurs de la kinase ATM et leurs caractéristiques (d'après Weber et Ryan, 2015)**

### 2.2.2 Inhibiteur du complexe multi-protéique DNA-PK

L'inhibition du complexe DNA-PK peut se faire par trois mécanismes différents. Le premier mécanisme met en jeu l'ARN interférence et permet la diminution de l'expression de la sous unité catalytique DNA-PKcs. En effet, des expériences réalisées in vitro et in vivo montrent que le miR-101 cible la DNA-PKcs sur l'extrémité 3'UTR des ARNm codant cette protéine diminuant ainsi le niveau d'expression de DNA-PKcs (Yan et al., 2010). Ce mécanisme est également impliqué dans l'inhibition de la kinase ATM. Le deuxième mécanisme est le blocage des autophosphorylations de la sous unité catalytique DNA-PKcs. Pour cela, un criblage a permis de déterminer

spécifiquement des anticorps dirigés contre les différents clusters de DNA-PKcs. Ces différents anticorps sélectionnés confèrent une radiosensibilité accrue aux radiations ionisantes et une diminution de l'activité kinase (Du et al., 2010). Le troisième mécanisme module l'activité kinase de DNAPKcs. Deux agents sont responsables de ce mécanisme d'inhibition. Il s'agit de la Chlorambucile (Willmore et al., 2008) et la mitoxantrone qui sont très efficaces sur certaines leucémies (Elliott et al., 2011). La mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase de type II et la Chlorambucile se lie aux Guanines afin de former un pont inter-brin grâce à des liaisons très stables empêchant la réplication de l'ADN. Ceci entraîne la mort cellulaire par apoptose des cellules cancéreuses. Pour finir, l'expression de la protéine KU est également dérégulée dans de nombreux cancers. Son niveau d'expression est considéré comme un marqueur prédictif pour la réponse aux radiations ionisantes lors des radiothérapies (Komuro et al., 2002).

### 2.2.3 Inhibiteur des voies de réparation NHEJ et HR

Les kinases ATM et DNA-PKcs ne sont pas les seules cibles des traitements anti-cancéreux. En effet, les protéines Mre11, Rad51 et la ligase IV sont aussi ciblées par des agents chimiques pour éradiquer les cellules cancéreuses. En ce qui concerne la protéine Mre11, la Mirin1 (ou Z-5-(4-hydroxybenzylidene)-2-imino-1,3-thiazolidin-4-one) exerce son action sur l'activité endonucléase de Mre11 et empêche l'activation de la kinase ATM par le complexe MRN (Dupré et al., 2008). Le NU6027 inhibe la protéine Rad51 dans les cellules cancéreuses du sein et de l'ovaire. C'est aussi un inhibiteur de la kinase ATR (Peasland et al., 2011). Pour terminer, le SCR7 inhibe la réparation des cassures double brin par NHEJ en se fixant sur le domaine de fixation à l'ADN de la ligase IV. Ceci empêche la fixation de la ligase IV au niveau des DSBs inhibant ainsi sa fonction de ligase. De plus, SCR7 empêche la progression tumorale dans des modèles de souris quand il est co-administré avec des thérapeutiques qui induisent des cassures double brin en potentialisant les effets de la radiothérapie (Srivastava et al., 2012).

### **3/ Importance de l'épigénétique dans la stabilité génomique**

#### **3.1 Importance de la méthylation du génome**

On retrouve des altérations de la méthylation de l'ADN dans de nombreux cancer. En effet, dans les cellules cancéreuses on retrouve une déméthylation globale de l'ADN mais une hyperméthylation au niveau de certains promoteurs de gènes au niveau des groupements CpG (Herman et Baylin, 2003). Ceci est l'origine d'un changement de la conformation de la chromatine, à l'activation et/ou à l'inactivation anormale de certains gènes et à l'instabilité génomique. En effet, dans une cellule normale, les groupements CpG à proximité des promoteurs de certains gènes sont protégés de la méthylation pour permettre la transcription de ces gènes alors que dans les cellules cancéreuses ces groupements sont hyperméthylés empêchant ainsi la transcription. De même, des régions qui étaient hyperméthylées deviennent hypométhylées dans les cellules cancéreuses permettant ainsi l'expression de gènes qui devraient être normalement éteints dans des cellules normales. Par exemple, une étude a montré que la perte de l'expression du gène codant pour la protéine p16 par hyperméthylation de son promoteur facilitait l'initiation de la tumorigénèse (Foster et al., 1998). L'hypométhylation des régions péri-centromérique est la source de l'instabilité génomique des cellules cancéreuses puisqu'elle prédispose les cellules aux DSBs et aux réarrangements chromosomiques. Les modifications épigénétiques étant réversibles, cela ouvre des perspectives prometteuses pour la thérapeutique. En effet, des inhibiteurs de méthyl-transférases comme le 5-azacytidine permettent la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs éteint par hyperméthylation. Plusieurs dérivés ont été testés en essais cliniques et ont donné des résultats prometteurs dans certaines leucémies (Villar-garea et al., 2003).

#### **3.2 Remodeleurs de la chromatine et modifications des histones**

En plus de l'hyperméthylation des promoteurs, il existe des modifications d'histones à l'origine d'inactivation épigénétique. En particulier, la tri-méthylation de la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) contribue fortement à l'inactivation de nombreux gènes. L'inactivation des gènes via le dépôt de cette marque implique la famille des protéines Polycomb. Pour préciser, c'est la protéine EZH2 qui est responsable du dépôt de cette marque inactivatrice au niveau de l'histone H3. Cette marque va permettre ensuite le recrutement du complexe Polycomb PRC1 qui va

ubiquitinyler la Lysine 119 de l'histone H3 pour maintenir l'état condensé et donc répressif de la chromatine.

La protéine EZH2 est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers et notamment dans les cancers du sein (Kleer et al., 2003) et de la prostate (Varambally et al., 2002). Cette augmentation d'expression est associée au développement de tumeurs particulièrement agressives et de mauvais pronostic (Bachmann et al., 2006).

Plusieurs autres études ont identifié des mutations au niveau de la Lysine 27 d'un variant de l'histone H3, H3.3 (Schwartzentruber et al., 2012 ; Sturm et al., 2012 ; Wu et al. 2012). Ces études ont identifié cette mutation sur un allèle du gène *H3F3A* codant pour le variant H3.3 dans 60% des cas des patients atteints d'un gliome. Chez ces patients, le niveau de H3K7me3 est globalement réduit. Cependant, les auteurs observent également que la marque H3K27me3 et le niveau d'expression d'EZH2 sont augmentés localement altérant ainsi l'expression de nombreux gènes. Ceci indique donc que cette mutation est à l'origine d'une reprogrammation totale de l'expression des gènes menant ainsi à la tumorigénèse (Chan et al., 2013).

Par opposition à son rôle d'oncogène, des mutations inactivant EZH2 ont été également observées dans des leucémies myéloïdes lui suggérant un rôle de suppresseur de tumeurs (Khan et al., 2013). Ainsi, l'activité d'EZH2 et en conséquence le dépôt de la marque H3K27me3 est perturbé par des mécanismes variés dans de nombreux cancers.

Pour conclure sur cette partie, le séquençage du génome des cancers humains a recensé plus de 300000 mutations, 120 de ces gènes ont été identifiés. La moitié de ces gènes code pour des protéines qui régulent la conformation de la chromatine par des modifications d'histones ou de l'ADN (Vogelstein et al., 2013). Parmi ces gènes on retrouve les gènes codant les protéines p300 et CBP. De nombreuses mutations au niveau de ces gènes sont retrouvées dans plusieurs cancers dont le cancer hépatocellulaire, le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer gastrique (Iyer et al. 2004). Une autre étude a montré que des mutations au niveau des gènes codant les protéines CBP et p300 sont associées au syndrome de Rubinstein Taybi caractérisé par un retard mental et une prédisposition au développement de cancer chez l'enfant (Spena et al., 2015).

### 3.3 Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs : Exemples des gènes suppresseurs de tumeur, *TP53* et *HIC1*

La réponse aux dommages à l'ADN joue le rôle de barrière à la progression tumorale en empêchant la prolifération cellulaire par l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs (Halazonetis et al., 2008). Ainsi, il n'est pas surprenant de voir que les tumeurs malignes montrent la perte des protéines clés de la DDR telles que les protéines ATM ou P53. Dans des cellules normales et en absence de dommages à l'ADN, la protéine P53 est très peu exprimée. En effet celle-ci est conduite au protéasome afin d'être dégradée grâce à l'action de la protéine MDM2, une E3 ubiquitine ligase. Par contre, en présence de DSBs, la protéine P53 va être stabilisée par différentes MPTs et notamment par plusieurs phosphorylations réalisées par la kinase CHK2 (pS15) à travers l'activation de la voie ATM/CHK2, la kinase CHK1 (pS20) à travers l'activation de la voie ATR/CHK1 (Bode et Dong, 2004) et via la kinase HipK2 qui va phosphoryler la Sérine 46 de la protéine P53 (Hofmann et al., 2002). Ces phosphorylations sont importantes pour l'activation transcriptionnelle des protéines pro apoptotiques telles que PUMA (P53 Up regulated Modulator of Apoptosis) ou Noxa. La protéine P53 peut également agir en dehors du noyau pour activer l'apoptose directement en stimulant la mitochondrie via les protéines Bax et Bak (Chipuk et al., 2004). La protéine P53 est un régulateur central dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose induite par la présence de DSBs non réparées dans les cellules cancéreuses. Cependant, le gène *TP53* est fréquemment muté dans de nombreux cancers (Freed-pastor et Prives, 2012).

Un autre exemple d'inactivation de gène suppresseur de tumeur est celui du gène *HIC1* (Hypermethylated In Cancer 1), celui-ci fera l'objet de la dernière partie de ce manuscrit.

## IV/ Le gène suppresseur de tumeur *HIC1* (Hypermethylated In Cancer 1)

### 1/ Découverte du gène *HIC1*

Le gène *HIC1*, a été caractérisé comme un candidat gène suppresseur de tumeur situé sur le bras court du chromosome 17, au niveau du locus 13.3 (17p13.3), une région souvent hyperméthylée ou délétée dans de nombreux cancers. Au niveau de cette région, se trouve le gène *TP53* situé au locus 17p13.1. Plusieurs études ont montré l'inactivation du gène *TP53* dans de nombreux cancers. Cependant, certains cancers comme par exemple le cancer du sein, présentaient des délétions au niveau du bras court du chromosome 17, 17p, sans que le gène *TP53* ne soit altéré par des mutations (Cornelis et al., 1994). Ceci suggère donc fortement l'existence d'autres gènes suppresseurs de tumeur situés en aval du gène *TP53* qui sont inactivés par perte d'hétérozygotie (LOH). Un second gène fut découvert et isolé par Wales et al., en 1995 par clonage positionnel à l'aide du marqueur D17S5/YNZ22 situé au niveau du locus 17p13.3 qui est une région souvent hyperméthylée dans de nombreux cancers tels que le cancer à non petite cellules du poumon (Eguchi et al., 1997) ou encore le cancer du foie (Kanai et al., 1999), d'où le nom « Hypermethylated In Cancer 1 » du gène *HIC1*

### 2/ structure génomique du gène *HIC1*

Le gène *HIC1* est constitué de 3 exons et de 3 promoteurs P0, P1 et P2 qui donneront jusqu'à 6 transcrits différents via les mécanismes d'épissage alternatif (Figure 30).

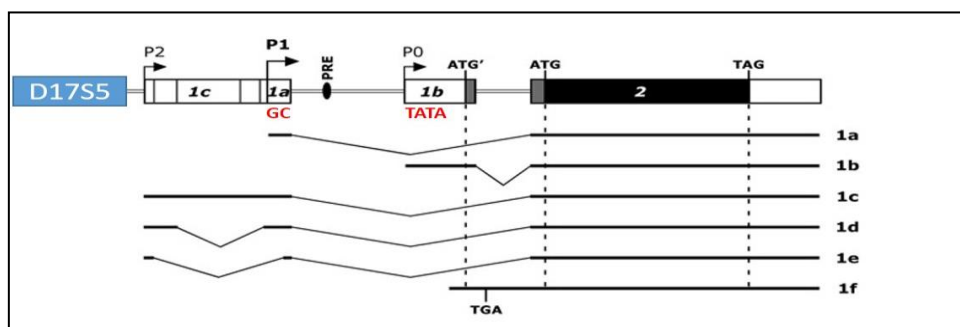


Figure 30 : Représentation schématique de la structure du gène *HIC1* et des différents transcrits codant la protéine *HIC1* (Jenal et al., 2010)

Le promoteur P0 de type TATA, est responsable de la transcription du variant minoritaire HIC1b. Celui-ci code pour une protéine de 733 acides aminés (Guerardel et al., 2001).

Le promoteur P1 riche en nucléotides GC est responsable de la transcription du variant prédominant HIC1a. Ce variant est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus normaux est code pour une protéine de 714 acides aminés (Guerardel et al., 2001).

Le promoteur P2 également riche en nucléotides GC est responsable de la transcription des variants HIC1c, HIC1d et HIC1e (Pinte et al., 2004).

Les variants HIC1a, HIC1b et HIC1c sont retrouvés dans les tissus normaux (Pinte et al., 2004) alors que les variants HIC1d et HIC1e ne sont pas exprimés. Une étude a montré que le variant HIC1f qui coderait pour une protéine de 22 acides aminés pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'expression de la protéine HIC1 dans les cellules cancéreuses et plus précisément dans les leucocytes humains (Mondal et al., 2006).

### **3/ Régulation de l'expression du gène *HIC1***

A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes régulent l'expression de HIC1 que ce soit positivement ou négativement. En effet, les protéines P53 et E2F1 permettent la transcription du gène *HIC1* alors que la méthylation de son promoteur l'inhibe (Rood et Leprince 2013).

#### **3.1 Activation de la transcription de la protéine HIC1 par la protéine P53**

En amont de la boîte TATA du promoteur P0 (Figure 30) se trouve un élément de réponse à la protéine P53, nommé PRE. En se fixant sur cet élément PRE, la protéine P53 va permettre la transcription du gène *HIC1* (Chen et al., 2005). Cet élément PRE est nécessaire à la transcription du gène *HIC1* puisque l'inactivation de la protéine P53 empêche la transcription de ce gène en réponse aux dommages à l'ADN (Wales et al., 1995 ; Chen et al., 2005 ; Britschgi et al., 2006).



### 3.2 Activation de la transcription de la protéine HIC1 par la protéine E2F1

Au niveau du promoteur proximal du gène *HIC1* se trouve deux éléments de réponse pour la protéine E2F1. Il a été montré que la protéine E2F1 permet la transcription du gène *HIC1* en se fixant sur ces éléments de réponse. De plus, en présence de DSBs, E2F1 se fixe sur ces éléments de réponse et augmente considérablement de 3 à 8 fois en fonction de la dose d'Etoposide le niveau d'expression d'ARN *HIC1* dans les cellules *Hep3B* (Jenal et al., 2009).

### 3.3 Inactivation de l'expression de HIC1 par hyperméthylation de son promoteur

Dans de nombreuses tumeurs solides, le gène *HIC1* est retrouvé non exprimé. Cette inactivation a pour origine l'hyperméthylation de son promoteur. Par exemple, l'hyperméthylation du gène *HIC1* est retrouvée dans 80% des patients atteints de cancer colorectal, dans les cancers du poumon (Eguchi et al., 1997), dans 67% des patients atteints du cancer du sein (Fujii et al., 1998), dans 96% des patients atteints du cancer de la prostate (Morton et al., 1996), dans 38% des patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire (Kanai et al., 1999), ou encore dans 100% des gliomes (Uhlmann et al., 2003). Cette hyperméthylation du gène *HIC1* conduit à la perte d'expression de la protéine dans ces différents cancers et peut être associée à l'agressivité des tumeurs et à une survie cellulaire nettement affaiblie (Wales et al., 1995 ; Nicoll et al., 2001; Rood et al., 2002). Cependant, la méthylation du gène *HIC1* n'est pas toujours corrélée à la pathologie cancéreuse. En effet, l'équipe de Fujii et al., a montré que 1 seul allèle du gène *HIC1* était hyperméthylé dans le tissu normal du sein contre deux dans les tissus mammaire cancéreux (Fujii et al., 1998). La même chose fut observée dans les tissus normaux du foie (Kanai et al., 1999), dans les tissus normaux prostatiques (Morton et al., 1996) et dans les tissus neuronaux (Rood et al., 2002). Ceci pourrait en partie expliquer pourquoi ces différents tissus pourraient avoir un grand risque de développer un cancer. De nombreuses études ont montré que la diminution d'expression de la protéine HIC1 contribue au développement de ces différents cancers via l'hyperméthylation de son promoteur. Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme à l'origine d'une diminution de l'expression de HIC1 puisqu'une étude a montré que la perte d'expression de la protéine HIC1 dans les leucémies myéloïdes aiguës n'était pas corrélée avec l'augmentation de la méthylation du

promoteur du gène HIC1 (Issa et al. 1997). Ainsi, il existe d'autres mécanismes inhibant l'expression de la protéine HIC1 pour induire la tumorigénèse notamment dans le cas des leucémies (Jena et al., 2010).

#### **4/ HIC1 un nouveau gène suppresseur de tumeur**

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui régulent négativement la prolifération cellulaire. Ces gènes sont souvent dérégulés dans les cancers. En effet, la perte de fonction de ces gènes conduit à la transformation des cellules normales non cancéreuses en cellules tumorales.

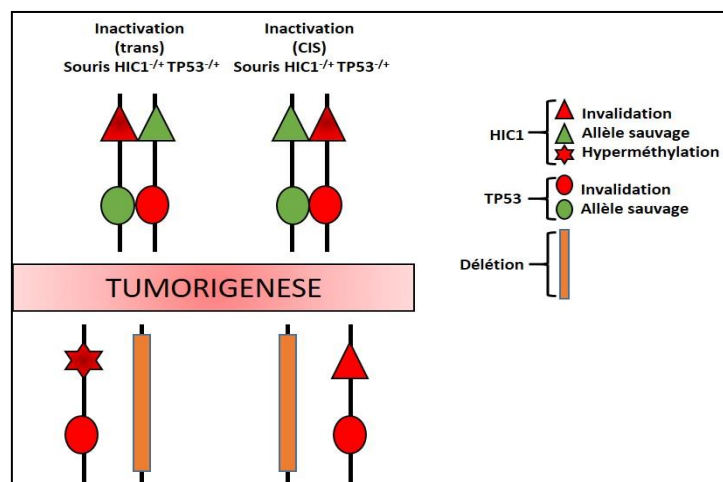
Le rôle du gène suppresseur de tumeur *HIC1* a été démontré grâce à des modèles murins. Tout d'abord, Chen et al., ont montré que les souris homozygotes *Hic1<sup>-/-</sup>* avaient de graves défauts au niveau de leur développement entraînant ainsi une létalité embryonnaire (Chen et al., 2003). De plus, les mêmes auteurs ont montré que les souris hétérozygotes *Hic1<sup>+/-</sup>* développaient spontanément des tumeurs avec une incidence accrue et plus précocement que les souris homozygotes *Hic1<sup>+/+</sup>*. En effet, 90 semaines après la naissance, 16.4% des souris *Hic1<sup>+/-</sup>* développaient des tumeurs alors qu'aucune n'était observée chez les souris *Hic1<sup>+/+</sup>*. De plus, les auteurs montrent que le sexe de l'animal influe sur le type de cancers développé. En effet, 75% des souris mâles développent préférentiellement des cancers épithéliaux alors que 85% des souris femelles développent des lymphomes ou des sarcomes. Pour finir, les auteurs montrent que l'hyperméthylation du second allèle de *Hic1* est à l'origine de ces différentes tumeurs chez les souris *Hic1<sup>+/-</sup>*.

Plus tard, une autre étude menée dans un modèle de souris double hétérozygote pour les gènes *Hic1* et *TP53* a montré que ces deux gènes coopèrent pour favoriser le développement des cancers (Chen et al., 2004).

Cette étude a montré que lorsque l'inactivation de ces deux gènes se faisait en *trans*, les souris *Hic1<sup>+/-</sup>* et *TP53<sup>+/-</sup>* développaient plus de tumeurs par rapport aux souris *TP53<sup>+/-</sup>*. L'inactivation des allèles restant est associée à une hyperméthylation de la copie sauvage du gène *Hic1* et à une délétion de la copie sauvage du gène *TP53* (Figure 31). Ainsi, les souris double hétérozygote développent avec une forte incidence des ostéosarcomes ayant un potentiel métastatique plus élevé indiquant que la perte de *Hic1* par hyperméthylation de son promoteur accentue le rôle du gène *TP53*

dans la tumorigénèse. De plus, 19% des souris double hétérozygote *Hic1*<sup>+/-</sup> *TP53*<sup>+/-</sup> développent plus de tumeurs ovariennes par rapport aux souris hétérozygote *TP53*<sup>+/-</sup>. Pour finir, ces souris double hétérozygote développent d'autres tumeurs qui ne sont pas observées chez les souris hétérozygote *TP53*<sup>+/-</sup> ou *Hic1*<sup>+/-</sup> comme par exemple des tumeurs neuroendocrines.

En revanche, si l'inactivation de ces deux gènes (*Hic1* et *TP53*) se fait sur le même chromosome, *en cis*, les souris développent plus rapidement des tumeurs que les souris *TP53*<sup>+/-</sup>. Dans ce cas, l'inactivation des allèles restant se fait par délétions chromosomiques (Figure 31).



**Figure 31 : Modèle de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *Hic1* et *TP53***

Une dernière étude utilise un modèle d'inactivation de deux gènes *Hic1* et *Ptch1* qui sont situés sur des chromosomes différents. Ce modèle montre la coopération entre ces deux gènes dans l'induction des médulloblastomes. Les médulloblastomes sont des tumeurs embryonnaires du tissu neuro-épithélial. Ce sont des tumeurs fréquentes chez l'enfant. Elles se caractérisent par une augmentation de la pression crânienne et un dysfonctionnement mental important. Ce cancer est dû à une altération de la voie Hedgehog menant à une accumulation des cellules précurseurs granulaires du cervelet (GCPs). La protéine Patch est le récepteur de Hedgehog. Ainsi, en se fixant sur Patch la protéine Hedgehog va inhiber la différenciation des cellules précurseurs GCPs. Une étude a montré que 10 à 15% des souris *Ptch*<sup>+/-</sup> développaient des médulloblastomes alors que les souris double hétérozygotes *Hic1*<sup>+/-</sup> et *Ptch1*<sup>+/-</sup> développaient 4 fois plus de médulloblastomes démontrant ainsi la coopération de ces deux gènes dans le développement de ces cancers.

## 5/ la protéine HIC1 est un répresseur transcriptionnel

### 5.1 Structure de la protéine HIC1

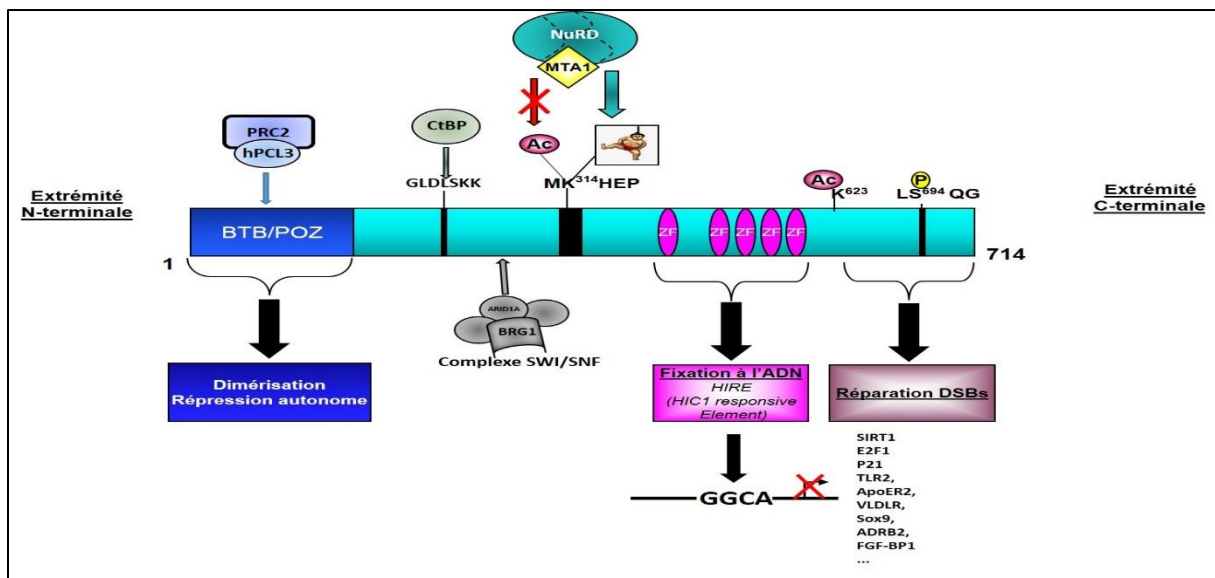
Le gène *HIC1* code un répresseur transcriptionnel de 714 acides aminés caractérisé par plusieurs domaines fonctionnels (Figure 32) :

- En N-terminal : un domaine BTB/POZ (*Broad complex, Tramtrack and Bric à brac/Poxviruses and Zinc finger*), qui est un domaine de répression autonome indépendant des HDACs (Histone deacetylase) de type I et II et de dimérisation impliqué dans les interactions protéiques (Albagi et al., 1995 ; Deltour et al., 1999). Ce domaine va être important pour le recrutement du complexe PRC2 (5.2.1)

- Une région centrale qui est également un domaine de répression autonome mais dépendant des HDACs de classes I et II. Cette région est régulée par différentes MPTs importantes pour le recrutement du complexe NuRD (5.2.2).

- Un domaine C-terminal contenant cinq doigts de zinc de type *Krüppel* C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> permettant la liaison à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique HIRE (*HIC1 responsive element*) : 5' <sup>c</sup>/GNG<sup>c</sup>/G**GGCA**<sup>c</sup>/ACC 3' centré sur le motif **GGCA** (Pinte et al., 2004 ; Rood & Leprince 2013).

- Une extrémité C-terminale bien conservée phylogénétiquement mais pour laquelle aucune fonction n'avait pu être établie. Cette région est importante pour la réparation des DSBs par l'intermédiaire de deux MPTs, la phosphorylation de la Sérine 694 et l'acétylation de la Lysine 623 (voir section 6.2).



**Figure 32 :** Représentation schématique du rôle des différentes régions de la protéine *HIC1* permettant le recrutement de complexes ou protéines répressives

## 5.2 Rôle des différents domaines de la protéine HIC1

### 5.2.1 Le domaine BTB/POZ

C'est un domaine de répression autonome indépendant des HDACs (Histone deacetylase) de type I et II et de dimérisation impliqué dans les interactions protéiques (Deltour et al., 1999). En effet, le domaine BTB-POZ est capable d'homodimérisation et d'hétérodimerisation *in vivo* avec le paralogue humain HRG22 (HIC1-Related on chromosome 22) (Deltour et al., 2001). De plus, même si ce domaine de répression transcriptionnelle est indépendant des HDACs, il a été montré que celui-ci interagissait avec la désacétylase SIRT1 (Silent mating type Information Regulation 2 homologue1) pour former un complexe de répression transcriptionnelle pour réprimer directement le gène *SIRT1* (Chen et al., 2005).

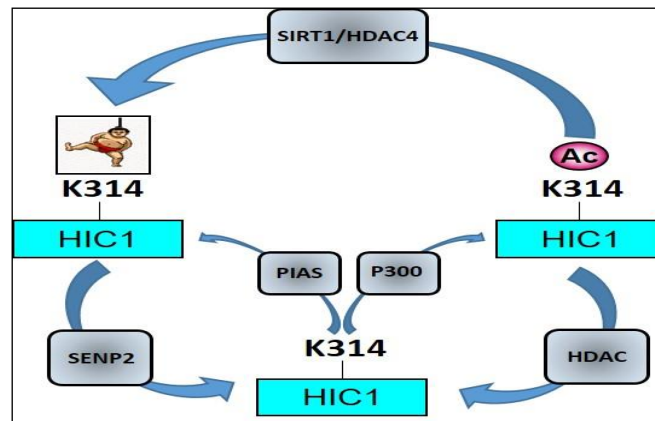
### 5.2.2 Les motifs GLDLSKK et MKHEP de la région centrale

Un alignement de séquence entre la protéine HIC1 et son paralogue HRG22 a été effectué chez différentes espèces et a permis de mettre en évidence deux motifs peptidiques très conservés (Deltour et al., 2002). Il s'agit du motif GLDLSKK et du motif  $\Psi$ KXEP où  $\Psi$  représente un acide aminé hydrophobe et X n'importe quel acide aminé.

En ce qui concerne le motif peptidique GLDLSKK, celui-ci va permettre la répression de différents gènes cibles de HIC1 via le recrutement du corépresseur CtBP (C-Terminal Binding Protein). Le domaine BTB/POZ de la protéine HIC1 n'interagit pas avec CtBP mais la dimérisation de ce domaine est nécessaire pour que CtBP interagisse avec HIC1 via le motif GLDSKK (Deltour et al., 2002).

En ce qui concerne le motif  $\Psi$ KXEP, celui-ci est très important pour la répression des gènes cibles de HIC1. Il s'agit du motif MK<sup>314</sup>HEP où la lysine 314 est soit SUMOylée soit acétylée. La SUMOylation joue un rôle dans la répression transcriptionnelle puisque l'attachement d'une protéine SUMO au niveau des facteurs de transcription inhibe la transcription par recrutement de corépresseurs transcriptionnels (Hay, 2005). Cette SUMOylation est régulée par les E3 ligases PIAS1 et PIAS $\alpha$  qui vont greffer une protéine SUMO ainsi que par la désSUMOylase SENP2 qui va enlever la protéine SUMO. De plus, la SUMOylation de cette lysine est en compétition avec une autre MPT, il s'agit de l'acétylation qui quant à elle inhibe l'interaction avec la protéine MTA1

(Stankovic-Valentin et al. 2007 ; Van Rechem et al., 2010). Cette lysine va être acétylée par P300. Ce dialogue entre ces deux MPTs compétitives est orchestré par un complexe comprenant deux désacétylases HDAC4 et SIRT1. En effet, SIRT1 est capable de désacétyler la lysine 314 de HIC1. Cette lysine devient alors accessible pour la SUMOylation qui est favorisée, entre autres, par une HDAC de classe II, HDAC4 via son activité E3 ligase, selon un mécanisme encore mal compris (Stankovic-Valentin et al. 2007) (Figure 33).



**Figure 33 : Régulation des MPTs de la Lysine 314 de la protéine HIC1**

### 5.2.3 La région C-terminale de la protéine HIC1

Le domaine C-terminal de la protéine HIC1 contient cinq doigts de zinc de type Krüppel C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> permettant la liaison à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique HIRE (HIC1 responsive element) : 5' c/GNGC/GGGGCAC/ACC 3' centré sur le motif GGCA (Pinte et al. 2004 ; Rood et Leprince, 2013). La protéine HIC1 de pleine longueur, surexprimée en cellules Cos7 ou endogène (cellules Daoy) est incapable de fixer un site HIRE unique (Pinte et al., 2004). Par contre, cette étude a montré que HIC1 pouvait lier une sonde contenant 5 cinq sites HIRE *in vitro*. De plus, ce fut grâce à cette séquence 5HIRE clonée en amont d'un vecteur luciférase, que l'équipe a pu montrer que la protéine HIC1 de pleine longueur était un répresseur transcriptionnel.

Le domaine de fixation à l'ADN est aussi la cible de MPTs. En effet, il a été montré que celui-ci était O-GlcNAcylé (Lefebvre et al., 2004). Cette étude montre que cette MPT n'affecte pas la liaison de HIC1 au niveau de l'ADN mais nécessite une conformation spatiale particulière de la protéine HIC1 impliquant la dimérisation du domaine BTB/POZ.

## 5.3 Rôle de répresseur transcriptionnel

### 5.3.1 Recrutement du complexe NuRD

La SUMOylation de la lysine 314 du motif MKHEP situé au niveau de la région centrale, favorise le recrutement de la protéine MTA1, un membre du complexe répresseur NuRD (Van Rechem et al. 2010). L'étude de Van Rechem et al., a démontré que le complexe HIC1/MTA1 va induire la répression de deux gènes cibles qui sont les gènes *Cycline D1* et *P57KIP2*. Le gène *Cycline D1* code pour une protéine cycline importante pour le checkpoint intracellulaire de la phase G1 du cycle cellulaire. En effet, en s'associant avec les protéines CDK4 ou CDK6, il va permettre la progression du cycle cellulaire. Le gène *P57KIP2* code pour un inhibiteur de protéine kinase cycline dépendant. C'est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire, il aurait un rôle dans la maintenance du statut non prolifératif des cellules en inhibant la progression cellulaire.

Pour finir, le récepteur EphA2 est également réprimé par HIC1 en recrutant la protéine MTA1 (Foveau et al., 2012). Cette étude a montré que l'inactivation de l'expression de la protéine HIC1 endogène par ARN interférence dans des cellules épithéliales normales de la glande mammaire conduit à l'augmentation de l'expression d'EphA2, en corrélation avec une augmentation de la migration cellulaire.

### 5.3.2 Recrutement du complexe PRC2

Grâce à un crible double hybride en levure utilisant le domaine BTB-POZ et la région centrale, l'équipe a pu montrer que la protéine HIC1 recrute le complexe PRC2 via la protéine hPCL3 (human Polycomb Like 3) (Boulay et al., 2012). La protéine hPCL3 permet le ciblage du complexe PRC2 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles pour les inactiver. En effet, l'équipe a démontré que HIC1 interagissait avec hPCL3 et son paralogue PHF1 pour former un complexe stable avec les différents membres du complexe PRC2 et notamment avec les protéines EZH2, EED, et SUZ12 pour réprimer directement ses gènes cibles. De plus, l'équipe a montré que HIC1 partage certains gènes cibles en communs avec PRC2 et en particulier le gène *Atoh1* qui code un facteur de transcription pro-neuronal indispensable au développement du cerveau (Briggs et al., 2008). En effet, l'inhibition de l'expression de la protéine HIC1 par ARN interférence conduit à un « décrochage » partiel de la protéine EZH2 au niveau du promoteur du gène *Atoh1*. Par ailleurs, *in vivo*, la répression du gène *Atoh1*

par le répresseur HIC1 est associée au complexe PRC2 au cours du développement du système nerveux chez la souris. Cette étude décrit pour la première fois qu'un facteur de transcription chez les mammifères est capable de recruter le complexe Polycomb PRC2 sur certains promoteurs cibles grâce à son interaction avec des protéines Polycomb like (Boulay et al., 2012).

Pour finir, la protéine HIC1 va recruter le complexe PRC2 via son domaine BTB-POZ au niveau d'un autre gène cible qui est le gène *Ephrin A1* (Zhang et al., 2010).

En ce qui concerne le gène *Ephrin A1*, celui-ci code pour une protéine qui fixe les récepteurs de type tyrosine kinase comme EphA2. L'équipe de Zhang a montré que l'inactivation du gène *HIC1* dans des modèles murins se traduisait par un défaut de développement. Ceci était associé à une dérégulation du niveau d'expression de *Ephrin A1*. En effet, une augmentation d'expression de *Ephrin A1* est observée chez les souris *Hic1*<sup>-/-</sup> développant des tumeurs mammaires. De plus, la réexpression de la protéine *Hic1* chez les souris ayant des tumeurs mammaires se traduit par une diminution de la masse tumorale associée à une restauration partielle du niveau d'expression d'*Ephrin A1* (Zhang et al., 2010). Pour finir, le récepteur *EphA2* est également un gène cible de HIC1 (Foveau et al., 2012). Ainsi, la dérégulation de la voie de signalisation *EphrinA1/EphA2* induite par la perte d'expression de HIC1 pourrait avoir un rôle important dans le développement de tumeurs épithéliales.

### 5.3.3 Recrutement de la protéine CtBP

La famille des protéines CtBP est très conservée chez les eucaryotes supérieurs. Chez les vertébrés, il existe deux gènes *CtBP1* et *CtBP2* qui codent pour les protéines CtBP1 et CtBP2. Ces protéines sont importantes pour la répression transcriptionnelle. Ensemble, le complexe HIC1/CtBP va réprimer la désacétylase *SIRT1* (Van Rechem et al. 2010) et *CXCR7* (Van Rechem et al., 2009). Le gène *CXCR7* code pour un récepteur couplé à une protéine G identifié comme un récepteur leurre pour la chimiokine SDF1. La fixation de la protéine SDF1 va activer une voie de signalisation permettant la migration cellulaire. La protéine *CXCR7* est fortement exprimée dans le cancer du sein, du poumon et dans les cancers de la prostate. L'étude de Van Rechem et al., a démontré que *CXCR7* est réprimé dans les cellules U2OS surexprimant la protéine HIC1. A l'inverse, l'inactivation de l'expression de *HIC1* endogène par ARN interférence dans les fibroblastes WI38 humains normaux se traduit par une



augmentation de l'expression de *CXCR7* (Van Rechem et al., 2009). Ainsi, la protéine HIC1 empêche la progression tumorale en partie en inhibant la protéine CXCR7 impliquée dans la migration cellulaire.

#### 5.3.4 Recrutement du complexe SWI/SNF

La région centrale est aussi une région qui permet l'interaction avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Van Rechem et al., 2009). Le complexe SWI/SNF est composé de nombreuses sous unités dont la sous unité catalytique BRG1 (III/3.1). Grâce au crible double hybride en levure utilisant le domaine BTB-POZ et la région centrale de la protéine HIC1, la sous unité du complexe SWI/SNF, ARID1A/BAF250A (A-T Rich Interaction Domain A1) a pu être isolée. Dans les fibroblastes quiescents, il a été montré que HIC1 recrutait la sous unité catalytique BRG1 pour réprimer la transcription du gène *E2F1* montrant ainsi son rôle dans la croissance cellulaire. De plus, l'étude de Van Rechem et al, a montré que HIC1 recrutait la protéine ARID1A pour réprimer la transcription du gène *ATOH1*.

#### 5.3.5/ La protéine HIC1 réprime d'autres gènes

A l'heure actuelle les données de la littérature nous indiquent que HIC1 réprime 8 autres gènes qui sont : *P21*, *TLR2*, *ApoER2*, *VLDLR*, *Sox9*, *ADRB2*, *FGF-BP1* et  $\Delta Np73$ .

Répression du gène *P21* : La protéine p21 tout comme la protéine P57KIP2 fait partie de la famille des inhibiteurs de protéines kinases cycline dépendant. Cette famille de protéine joue un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN dépendant de la protéine P53. De manière plus générale, en réponse aux dommages à l'ADN, la protéine P53 va être stabilisée et va permettre la transcription du gène *P21* pour stopper la progression cellulaire. De plus, il existe une boucle de régulation complexe entre les protéines HIC1, SIRT1, P53 et p21 en réponse aux dommages à l'ADN (Voir section 6). Ainsi, par des expériences d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP), l'équipe a démontré que *P21* est un gène cible direct de HIC1 (Dehennaut et al., 2013).

Répression du gène *TLR2* : Le gène *TLR2* code pour un récepteur de type TOLL important pour la réponse immunitaire puisqu'il reconnaît des motifs spécifiques

conservés au niveau de nombreux pathogènes. TLR2 agit comme une protéine senseur de la flore microbienne et permet d'initier la réponse immunitaire en activant des mécanismes d'inflammation. Suite à la fixation de son ligand, la protéine TLR2 va activer la signalisation de NF- $\kappa$ B qui permettra d'induire l'expression des cytokines et des enzymes pro-inflammatoires telles que le facteur TNFalpha ou encore l'interleukine 6. Une étude a montré que le niveau d'expression de TLR2 était augmenté dans des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour le gène *HIC1*, mais également dans des cellules humaines où le gène *HIC1* a été invalidé (Janeckova et al., 2015). De plus, cette étude montre une corrélation entre l'inhibition de l'expression de la protéine HIC1, l'augmentation de l'expression de TLR2 et la croissance des tumeurs colorectales chez la souris.

Répression des gènes *ApoER2* et *VLDLR* : Ces gènes codent pour des récepteurs de la famille des récepteurs LDL important pour l'homéostasie du cholestérol (Reddy et al., 2011). Ces récepteurs ont un ligand commun qui est la Reelin. La Reelin est une protéine de la matrice extra cellulaire importante dans la régulation de la migration des cellules précurseurs neuronales lors du développement du cervelet (Forster et al., 2010). Par des expériences de ChIP, l'équipe a montré que ces deux gènes étaient des gènes cibles directs de HIC1 et que l'inactivation du gène *HIC1* se traduisait par une augmentation de l'expression de ces gènes, ce qui pourrait contribuer à la progression tumorale au niveau du cerveau (Dubuissez et al., 2013).

Répression du gène *ADRB2* : Le gène *ADRB2* code pour un récepteur couplé aux protéine G (RCPG) activé par l'adrénaline et la noradrénaline. *In vivo*, l'activation d'*ADRB2* favorise la croissance tumorale et la formation de métastases par exemple dans le cancer de l'ovaire (Sood et al., 2006). L'équipe a montré dans une lignée cellulaire cancéreuse du sein (MDA-MB-231) que le niveau d'expression accrue d'*ADRB2* était corrélé avec une abolition de l'expression de *HIC1* et que la réexpression de HIC1 permettait la répression d'*ADRB2* limitant ainsi l'invasion et de la migration cellulaire (Boulay et al., 2012). De plus, par des expériences de ChIP, l'équipe a montré que *ADRB2* est un gène cible direct de HIC1.

Répression du gène *FGF-BP1* (Fibroblast Growth Factor-Binding Protein 1) : Ce gène code pour une protéine de la matrice extra cellulaire qui est importante pour l'activation

de la voie de signalisation impliquant le FGF. Une étude a montré qu'il existait au niveau du promoteur de *FGF-BP1* un site de fixation pour la protéine HIC1 qui permet la répression de celui-ci suite à la stimulation par le TGF $\beta$  (Transforming-Growth Factor-béta) pour induire la différenciation des cellules musculaires lisses (Briones et al., 2006).

Répression du gène  $\Delta Np73$  :  $\Delta Np73$  code pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription P53. Cette protéine à la caractéristique de ne pas posséder de domaine de transactivation ce qui lui confère un rôle de dominant négatif. Ainsi, cette protéine va induire l'inhibition de la protéine P53. Une étude a montré que le niveau d'expression de cette protéine était fortement augmenté dans les cancers de l'œsophage et dans les cancers gastriques et que ceci était associé avec un faible pronostic de survie (Vilgelm et al., 2010). De plus, cette étude a montré par des expériences de CHIP, que ce gène est réprimé par HIC1 dans les cellules épithéliales normales de la muqueuse contrôlant ainsi le potentiel oncogénique de  $\Delta Np73$ .

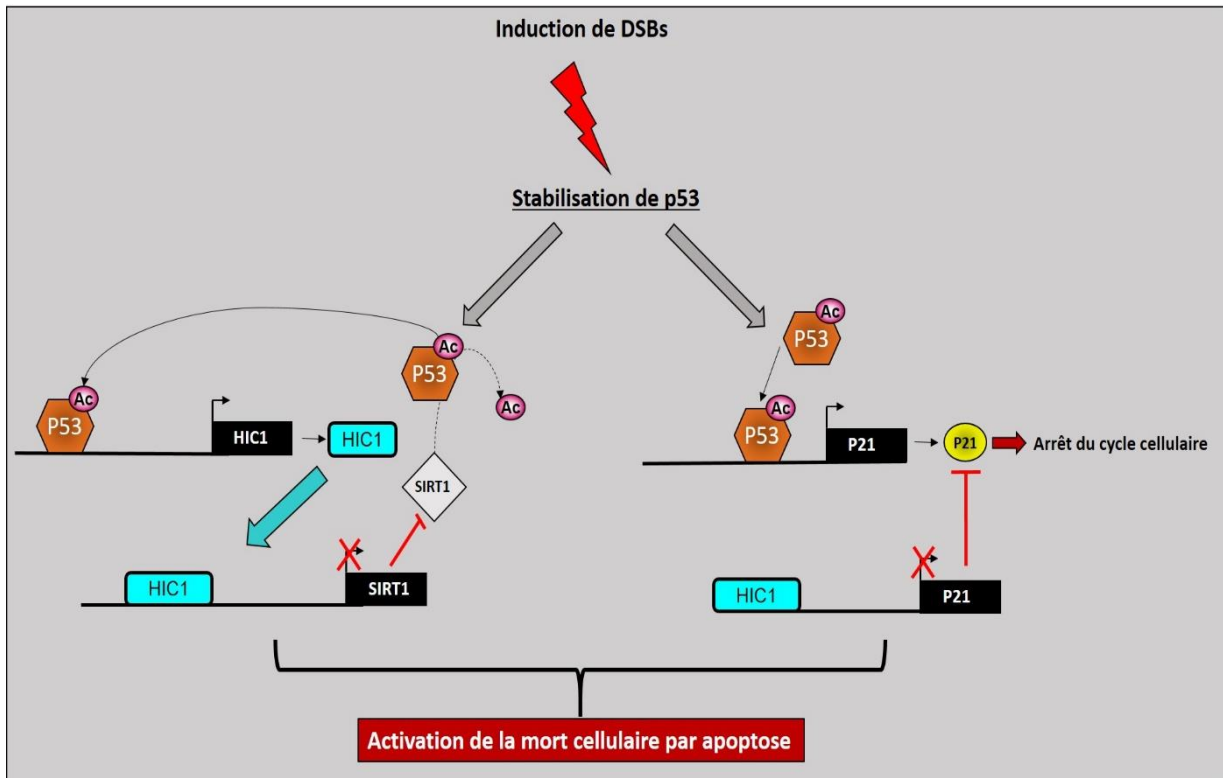
## **6/ Rôle de la protéine HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN**

HIC1 joue un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN, qu'ils soient non réparables ou réparables (Chen et al., 2005 ; Dehennaut et al., 2013 ; Paget et al., en révision).

### **6.1 Rôle de HIC1 dans la réponse aux dommages non réparables**

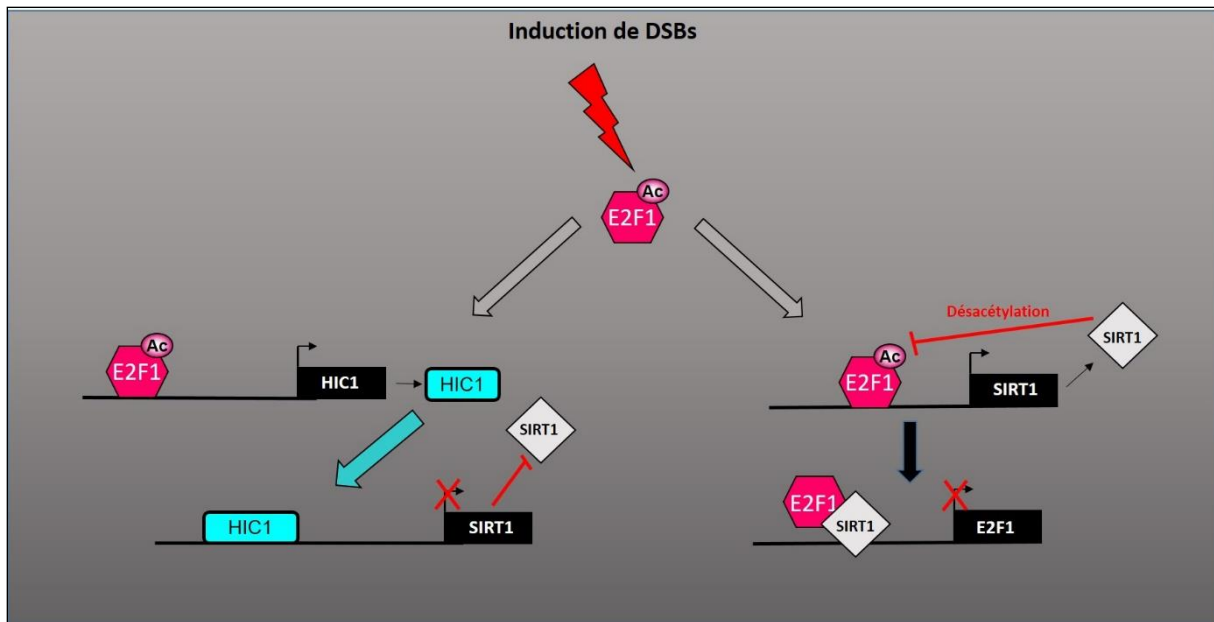
HIC1 est au centre de boucles de régulation complexes mettant en jeu le gène suppresseur de tumeur *TP53* et la désacétylase *SIRT1* entre autres. En effet *HIC1* et *SIRT1* sont deux gènes cibles directs de P53. Cependant, la désacétylation de P53 par *SIRT1* l'inactive. De plus, en réponse aux dommages à l'ADN non réparables (Etoposide 16h) *HIC1* réprime l'expression de *SIRT1* permettant ainsi l'apoptose médiée par P53 (Figure 34) (Chen et al., 2005). Cette boucle c'est complexifié avec l'arrivé d'un nouvel acteur, il s'agit de la protéine p21. De manière plus générale, en réponse aux dommages à l'ADN, la protéine P53 va être stabilisée et va permettre la transcription du gène *P21* pour stopper la progression cellulaire et mettre en place les mécanismes de réparation. Cependant, en présence de dommages non réparables, *HIC1* va réprimer directement l'expression de la protéine P21 pour induire la mort

cellulaire par apoptose (Dehennaut et al., 2013). De plus, en réponse aux dommages à l'ADN non réparables, on observe une augmentation de la SUMOylation de la Lysine 314 de la protéine HIC1 de manière dépendante de la kinase ATM puisque cette augmentation est perdue lorsque l'on utilise un inhibiteur spécifique de cette kinase (Dehennaut et al., 2013). HIC1 est donc important pour la réponse apoptotique médiée par P53 lors de dommages non réparables en favorisant le recrutement de MTA1 au niveau de *SIRT1* (Paget et al., en révision).



**Figure 34 : Boucle de régulation entre les protéine HIC1/ P53/SIRT1 et P21 dans l'induction de l'apoptose**

Il existe une seconde boucle de régulation mettant en jeu les protéines HIC1, E2F1 et SIRT1 (Figure 35). En effet, il a été montré que la protéine E2F1 permet la transcription du gène *HIC1* en se fixant sur ces éléments de réponse en présence de DSBs (Jenal et al., 2009). De plus, *SIRT1* est aussi une cible directe de la protéine E2F1 en réponse à l'induction de DSBs. Cependant il existe un rétro contrôle qui permet de réguler l'expression de la protéine E2F1 (Wang et al., 2006). Les auteurs montrent que SIRT1 va inactiver E2F1 en le désacétylant. De plus SIRT1 va former un complexe avec la protéine E2F1 inactive. Ce complexe va se fixer au niveau du promoteur de *E2F1* pour inhiber sa transcription.



**Figure 35 :** Boucle de régulation impliquant les protéines HIC1, SIRT1 et E2F1 en réponse aux DSBs

### 6.2 Rôle de HIC1 dans la réparation des DSBs

HIC1 joue également un rôle important lors de dommages à l'ADN réparables (Etoposide 1h). En effet, l'inactivation de *HIC1* par siRNA dans les fibroblastes induit une persistance des foyers  $\gamma$ H2AX et une réparation plus lente des dommages à l'ADN par rapport à des fibroblastes humains exprimant HIC1 comme l'ont montré des essais comètes (Dehennaut et al., 2013). De plus, mes travaux de thèse ont permis de découvrir que la région C-terminale de HIC1 était importante pour la réparation des DSBs par l'intermédiaires de deux modifications post-traductionnelles qui sont la phosphorylation de la Sérine 694 induite par la kinase ATM (Paget et al., en préparation) et l'acétylation de la Lysine 623 induite par l'acétyl-transférase Tip60 (Résultats non publiés et détaillés dans la partie résultats complémentaires). En ce qui concerne le rôle potentiel de Tip60 dans l'acétylation de la Lysine 623 l'équipe a montré que HIC1 interagissait avec celle-ci (Van Rechem et al., résultats non publiés). Les résultats concernant le rôle de la phosphorylation de la Sérine 694 font l'objet d'une 2<sup>ème</sup> publication en préparation dont le contenu sera détaillé dans la partie résultats de ce manuscrit.

# **RESULTATS**

## **Publication n°1**

### **HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair but is essential for the apoptotic DNA-damage response (DDR) to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs)**

**En révision dans le journal Oncotarget (14 Avril 2016)**

**Sonia PAGET**, Marion DUBUISSEZ<sup>£</sup>, Vanessa DEHENNAUT, Joe NASSOUR<sup>\$</sup>, Brennan T. HARMON<sup>1</sup>, Corinne ABBADIE, Brian R. ROOD<sup>2</sup> and Dominique LEPRINCE\*.

La version de l'article soumise à Oncotarget est insérée à la suite de cette page de présentation. Puis la version des figures en cours de révision est décrite.

**HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair  
but is essential for the apoptotic DNA-damage response (DDR)  
to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs).**

Sonia PAGET, Marion DUBUISSEZ<sup>£</sup>, Vanessa DEHENNAUT, Joe NASSOUR<sup>\$</sup>, Brennan T. HARMON<sup>1</sup>, Corinne ABBADIE, Brian R. ROOD<sup>2</sup> and Dominique LEPRINCE\*.

Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille. France

1- Genomics Core, Children's National Medical Center, Washington DC, USA.

2- Center for Cancer and Immunology Research, Children's National Medical Center, Washington DC, USA.

Present Addresses: £ Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boulevard l'Assomption Montreal, QC H1T 3W5, Canada. \$ The Salk Institute for Biological Studies, Molecular and Cell Biology Department, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA.

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: + 33 3 20 87 11 19

Fax: +33 3 20 87 11 11 Email: dominique.leprince@ibl.cnrs.fr



## ABSTRACT

The tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) encodes a transcriptional repressor mediating the p53-dependent apoptotic response to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs) through direct transcriptional repression of *SIRT1*. *HIC1* is also essential for DSB repair as silencing of endogenous *HIC1* in BJ-TERT fibroblasts significantly delays DNA repair in functional Comet assays. *HIC1* SUMOylation on Lysine 314 positively regulates its interaction with MTA1, a component of NuRD complexes. In contrast with irreparable DSBs induced by 16-hours of etoposide treatment, we show that repairable DSBs induced by 1h etoposide treatment do not increase *HIC1* SUMOylation or its interaction with MTA1. Furthermore, *HIC1* SUMOylation is dispensable for DNA repair since the non-SUMOylatable E316A mutant is as efficient as wt *HIC1* in Comet assays. Upon induction of irreparable DSBs, the ATM-mediated increase of *HIC1* SUMOylation is independent of its effector kinase Chk2. Moreover, *HIC1* interaction with MTA1 relies on both *HIC1* SUMOylation and the MTA1 SIM (SUMO-interacting motif) motif within NuRD repressive complexes since BIX-01294, a specific inhibitor of MTA1 methylation, inhibits this interaction. In addition, we demonstrate that irreparable DSBs strongly increase the interaction of *HIC1* with MTA3, thus favoring its binding to the *SIRT1* promoter. To further characterize the molecular mechanisms sustained by this increased repression potential, we established global expression profiles of BJ-TERT fibroblasts transfected with *HIC1*-siRNA or control siRNA and treated or not with etoposide. We identified 475 genes potentially repressed by *HIC1* with cell death and cell cycle as the main cellular functions identified by pathway analysis. Thus, our data demonstrate that *HIC1* SUMOylation is important for the transcriptional response to non-repairable DSBs but dispensable for DNA repair and suggests a dual function of *HIC1* either as a “repair” factor or as a “classical” transcriptional repressor during the apoptotic DNA damage response.

**Keywords:** DNA-damage Response, SUMOylation, *HIC1*, MTA1, ATM.

## INTRODUCTION

The genomic integrity of all living organisms is constantly challenged by deleterious attacks such as ionizing radiation or genotoxic stress. DNA-damage and in particular DNA double-strand breaks (DSBs) are highly deleterious since they can be lethal if unrepaired or predispose to oncogenic transformation if misrepaired. To cope with these lesions, cells have developed multiple interacting pathways called the DNA-damage response (DDR) that lead either to damage repair or to programmed cell death depending on the extent of the damage [1]. A multi-branched, highly coordinated signaling cascade of Post-Translational Modifications (PTM) allows the effective recruitment, stabilization and retention at DSBs of numerous proteins including sensors, mediators and effectors of the DDR [2]. A major transducer of DNA damage signaling in the case of DSBs is the activation of the PIKKs (Phosphatidylinositol 3 kinase-like protein kinase) ATM or DNA-PKcs proteins. In particular, the apical ATM kinase phosphorylates hundreds of proteins including histones (H2Ax), repair factors (BRCA1), its effector kinase (Chk2) or transcription factors such as P53 [3]. Previous studies demonstrated that together with P53, SIRT1 and the tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated in cancer 1*), which is epigenetically silenced by promoter hypermethylation in many types of human cancers [4, 5], plays a critical role in the DNA damage response [6] [7] [8]. Indeed, *HIC1* is a direct target-gene of P53 and upon induction of irreparable DSBs, *HIC1* regulates the p53-dependant apoptotic DNA-damage response [6]. When treated overnight with etoposide, a DSB inducer, wt Murine Embryo Fibroblasts (MEFs) rapidly begin to die whereas *Hic1*<sup>-/-</sup> MEFS are resistant to apoptosis. Conversely, re-expression of *HIC1* in MCF-7 cells through adenoviral infection restores their sensitivity to P53-induced apoptosis after DSB induction [6]. This effect relies mainly on the *HIC1*-mediated by direct transcriptional repression of *SIRT1*, which deacetylates and inactivates P53 allowing cells to by-pass P53 induced apoptosis and survive DNA-damage [6]. Recently, we have shown that *HIC1* is also a key player in the response to

repairable DNA-damage. Down-regulation of endogenous *HIC1* expression through RNA interference in normal human fibroblasts treated for 1 hour with Etoposide delays DNA repair, as shown by functional comet assays [8].

*HIC1* encodes a transcriptional repressor containing an N-terminal BTB domain and five C-terminal C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> *Krüppel*-like Zinc fingers [9]. We have shown that HIC1 interacts with 4 major co-repressors complexes involved in chromatin remodelling and epigenetic regulation; CtBP, SWI/SNF, NuRD and the *Polycomb* PRC2 complex [9]. In particular, we have demonstrated through yeast two-hybrid screening and various biochemical approaches that HIC1 interacts with the C-terminal region of MTA1, a core component of NuRD, through a SUMOylation consensus motif in the HIC1 central region [10, 11]. SUMOylation is a highly dynamic and labile PTM that plays a key role in the assembly of multi-protein complexes [12]. The HIC1-MTA1 interaction is regulated by two mutually exclusive PTM of Lysine 314, promotion by SUMOylation and inhibition by acetylation [10, 11]. Previously, we demonstrated that irreparable DSBs induced by a 16h treatment with etoposide result in a specific increase of HIC1 SUMOylation in an ATM-dependant manner [8]. This increase of HIC1 SUMOylation is correlated with an increased interaction of endogenous HIC1 and MTA1 proteins in etoposide treated normal human fibroblasts, thereby favouring the recruitment of NuRD repressive complexes onto HIC1 target genes [8].

In this study, we further investigated the function and regulation of HIC1 SUMOylation during the DNA-damage response to repairable and non-repairable DSBs. First, we demonstrate that HIC1 SUMOylation does not increase upon induction of repairable DSBs by a 1h etoposide treatment. In addition, results from functional DNA repair assays such as Comet assays using overexpression in Cos-7 cells of wt or non-SUMOylatable (E316A) HIC1 demonstrated that SUMOylation on Lysine 314 is not implicated in DSB repair. Indeed, the efficiency and kinetics of repair exhibited by the E316A point mutant and wild-type HIC1 are virtually

indistinguishable. Furthermore, we show that the increased SUMOylation of HIC1 in the presence of irreparable DSBs induced by a 16 hours etoposide treatment is strictly dependent on ATM which is stabilized and activated on chromatin but independent of its nucleoplasmic effector kinase Chk2. As for the HIC1-MTA1 interaction, we showed that it depends on a non-covalent interaction between SUMOylated HIC1 and the SUMO-interacting motif (SIM) in the C-terminal part of MTA1. Finally, the interaction between endogenous HIC1 and MTA1 is lost in the presence of Bix-01294, an inhibitor of MTA1 methylation on Lysine 532, thereby supporting its implication in NuRD repressive complexes. Furthermore, we demonstrated that HIC1 also interacts with the related corepressor MTA3. This interaction is favored upon induction of irreparable DSBs and results in an increased recruitment of MTA3 onto HIC1-response elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter. To further characterize the molecular mechanisms sustained by this increased repression potential, we established global expression profiles of BJ-TERT fibroblasts transfected with HIC1-siRNA or control siRNA and treated or not with etoposide. We identified 475 genes potentially repressed by HIC1 with cell death and cell cycle as the main cellular functions identified by pathway analysis. In summary, our results demonstrate that HIC1 SUMOylation is dispensable for DNA repair but is important for the p53-dependent apoptotic transcriptional response to irreparable DSBs, notably through the recruitment of MTA1 or MTA3 containing NuRD repressive complexes to the *SIRT1* promoter. They suggest that the transcription factor encoded by the tumor suppressor gene *HIC1* could fulfill a dual function depending on the intensity of the damages and act either as a “repair” factor or as a “classical” transcriptional repressor during the apoptotic DNA damage response.

## RESULTS

*Repairable DNA DSBs do not result in a PIKK-dependant increase of HIC1 SUMOylation and interaction with MTA1.*

We previously demonstrated that induction of non-repairable DSBs by overnight (16h) treatment of transfected HEK293T cells with 20  $\mu$ M etoposide, an inhibitor of topoisomerase II known to induce DSBs, results in a significant increase of HIC1 SUMOylation [8]. Such a prolonged assault leads to the accumulation of non-repairable damage resulting in a p53-dependent apoptotic response [6]. HEK293T cells were transfected with the empty FLAG or FLAG-HIC1 expression vectors with or without an expression vector for His-SUMO2 and/or the de-SUMOylase SENP2. 48 hours after transfection, cells were treated with 20 $\mu$ M etoposide for 16 hours to induce non-repairable DNA damage and immediately lysed under denaturing conditions. Total extracts were then analyzed by Western blot with anti-FLAG monoclonal antibodies to detect HIC1 and its SUMOylated forms. As shown in Figure 1A, the isoform of higher molecular weight, corresponding to the SUMOylated form of HIC1, disappeared in presence of SENP2 and is significantly increased after 16h etoposide treatment, as previously shown [8].

Since endogenous HIC1 also regulates the kinetics and/or efficiency of DSB repair in BJ-TERT fibroblasts, we next wanted to address the importance of HIC1 SUMOylation in the repair process [8]. In striking contrast with the ATM-dependent increase of HIC1 SUMOylation observed in HEK293T cells treated for 16 hours with etoposide [8], HIC1 SUMOylation levels do not increase after the induction of repairable DSBs by a short (1 hour) etoposide treatment (Figure 1B, lanes 1 and 2). This HIC1 SUMOylation is also independent of ATM activation since its level remains constant when cells are pre-incubated for 1h with the specific ATM

inhibitor Ku-55939 prior to the 1 hour etoposide treatment (Figure 1B, lanes 3 and 4). The decrease of ATM autophosphorylation on Serine 1681 and of  $\gamma$ H2Ax confirms the effectiveness of the ATM inhibitor treatment (Figure 1B, lane 4).

DNA-damaging agents that create DSBs activate a DDR primarily relying on the activation of kinases of the PIKKs (Phosphatidylinositol 3 kinase-like protein kinase) family, ATM or DNA-PKcs proteins [18]. After induction of repairable damage (1 hour etoposide treatment), inhibition of ATM and DNA-PKcs by Wortmaninn, a PI3K inhibitor also inhibiting PIKKs, or by pharmacological inhibitors specific for each PIKK, has no significant effects on HIC1 SUMOylation (Figure 1C). Previously, we demonstrated that SUMOylation potentiates the repressive potential of HIC1 by favoring its interaction with MTA1 [10] [11], notably during the response to non-repairable DSBs [8]. However, after induction of repairable DSBs by a 1 hour treatment with etoposide, co-immunoprecipitation experiments in HEK293T cells transfected with expression vectors for HIC1 and MTA1 clearly failed to demonstrate a stronger interaction between these two proteins (Figure 1D).

In conclusion, repairable and non-repairable DSBs, induced by 1 hour or 16 hours etoposide treatments respectively, have different impacts on HIC1 SUMOylation and hence on the interaction between HIC1 and the NuRD complex, potentially in line with the biological outcomes of the DNA-damage responses to these different genotoxic insults, repair or apoptosis.

*Lack of HIC1 SUMOylation does not impair DNA repair in Comet assays.*

To address the functional impact of HIC1 SUMOylation on the time-course of DSBs repair, we next compared the DNA repair capacity of HEK293T cells transfected with wt HIC1 or with the non SUMOylatable E316A point mutant. HIC1 Lysine 314 can be acetylated and SUMOylated [10, 11]. Therefore, we used the E316A mutant (non SUMOylatable since the

SUMOylation consensus is  $\phi$ KxE) instead of the K314R mutant since this latter would impede not only SUMOylation but also acetylation or any other potential post-translational modifications on this lysine residue [19]. We thus tested wt HIC1 and the E316A mutant in the neutral comet assay which specifically measured DSBs at the level of individual cells. To that end, 48 hours after transfection, cells were treated for 1 hour with etoposide before recovery in complete culture medium without etoposide for various times. Results showed that the same amount of DSBs were induced in HEK293T transfected with the two expression vectors. Furthermore, no salient differences were observed during the time-course recovery in normal medium of cells expressing the wt or the E316A SUMO-deficient HIC1 mutant (Figure 2). Thus, these results unambiguously demonstrate that HIC1 SUMOylation on lysine K314 is not essential for DSBs repair.

*HIC1 SUMOylation increase after 16 h etoposide treatment is dependent of ATM.*

DSBs elicit a DNA damage response primarily relying on the activation of the ATM or DNA-PKcs kinases which have complementary and non-redundant functions [18, 20]. Whereas ATM has hundreds of substrates, DNA-PKcs phosphorylates a smaller group of proteins involved in DSBs end joining. [21]. We tried to inhibit ATM and DNA-PKcs by a 1 hour pre-treatment with Wortmaninn or with specific pharmacological inhibitors for each PIKK prior to a 16 hours etoposide treatment to induce non-repairable DSBs in the presence of these inhibitors as previously performed with the ATM specific inhibitor [8]. However, in these conditions where the DNA-PKcs inhibitor was kept on the cells for 17 (1+16) hours, a strong cytotoxic effect precluding further analyses was observed (data not shown). To circumvent this technical problem, we then used siRNA interference to inactivate DNA-PKcs or ATM, as a positive control. Upon induction of irreparable damage, the increase of HIC1 SUMOylation was

observed in cells transfected with control siRNAs but not in cells transfected with a pool of siRNAs efficiently targeting ATM (Figure 3, lanes 1 to 4). These findings therefore nicely confirmed our previous results obtained with the pharmacological ATM inhibitor, Ku-55933 [8]. Silencing of DNA-PKcs by siRNAs did not fully abolish the increase of HIC1 SUMOylation as shown for ATM siRNAs but nevertheless did strongly impair it (Figure 3, lanes 5 and 6). However, in the control Western blots, we noticed that this pool of siRNAs targeting DNA-PKcs down regulate not only the expression of DNA-PKcs (total) and of pDNA-PKcs (autophosphorylated) (Figure 3, lanes 3 and 4) but also surprisingly the expression of ATM and pATM (Figure 3, lanes 5 and 6). These results were confirmed by qRT-PCR analyses of ATM expression levels in the same transfected cells (Supplementary Figure 1). Thus, the increase of HIC1 SUMOylation observed upon induction of irreparable DSBs appears to be dependent upon ATM.

*HIC1 SUMOylation increase is dependent on the apical kinase ATM but independent of its effector kinase Chk2.*

After detection of DSBs by sensors such as the MRN complex, DNA-damage signaling is rapidly induced by the activation of the ATM/Chk2 pathway. Whereas the apical ATM kinase is recruited to and stabilized on the DSBs sites, its effector kinase Chk2 becomes phosphorylated by ATM at damage sites but then rapidly dissociates and is distributed throughout the nucleus to phosphorylate numerous downstream targets [2] [22]. To determine whether the HIC1 SUMOylation increase after irreparable DSB induction requires the complete activation of the ATM/Chk2 pathway and is dependent on both ATM and Chk2 activation, FLAG-HIC1-transfected cells were pre-incubated with C3742, a specific inhibitor of Chk2, prior to a 16 hour etoposide treatment (Figure 4A). Both the basal and enhanced SUMOylation of HIC1 observed after induction of irreparable DSBs remained unchanged in presence of the



Chk2 inhibitor (Figure 4A, lanes 4 to 8). As controls for the effectiveness of the Chk2 inhibitor, we observed a strong decrease of Chk2 autophosphorylation on Serine 516 as well as of phosphorylation of P53 on Serine 20, a well-known target of Chk2.

To confirm these results with an independent assay, we used siRNA interference to inactivate Chk2. We first demonstrated the efficiency of a pool of siRNAs (Dharmacon) targeting Chk2 by transfection in HEK293T grown in standard conditions (no etoposide treatment) followed by qRT-PCR (Figure 4B). Using this pool of siRNAs targeting Chk2, we further showed that the increase of HIC1 SUMOylation observed after a 16 hour etoposide treatment is not significantly affected by Chk2 inhibition (Figure 4C).

In conclusion, the increase of HIC1 SUMOylation upon induction of non-repairable DSBs is dependent upon the apical kinase ATM [8] but not its downstream effector kinase Chk2. Thus, these results strongly suggest that the increase of HIC1 SUMOylation occurs and plays a role in close vicinity to chromatin where ATM is activated and stabilized.

*The SIM (SUMO-interacting motif) of MTA1 is required for the interaction with HIC1.*

Since the induction of non-repairable DSBs and the resulting increase in SUMOylation of HIC1 favors its interaction with MTA1, we further investigated the molecular mechanisms underpinning the HIC1-MTA1 interaction with a focus on SUMOylation [8, 11]. A SUMOylated protein can interact non-covalently with another protein containing a SIM (SUMO-interacting motif) [19]. MTA1 contains in its C-terminal end a functional SIM motif DEPIVIED (Figure 5A) perfectly fitting with the most canonical class of SIM motifs, a hydrophobic core (V/I)X(V/I)(V/I) flanked by acidic amino acids [13, 23]. Interestingly, triple mutations in the hydrophobic core of the SIM motif in MTA1 (I711A/V712A/I713A, referred to hereafter as AAA) abolished the interaction of MTA1 with HIC1 (Figure 5B, lane 5). MTA1

is also SUMOylated on Lysine 509, which is located in its C-terminal region [13]. However, in contrast with the AAA SIM mutant, wt MTA1 and the K509R non-SUMOylatable mutant similarly interacted with HIC1 in co-immunoprecipitation experiments, demonstrating that MTA1 SUMOylation is not required for this interaction (Figure 5C, lane 5 and 6).

Thus, the SIM motif of MTA1 is essential for the interaction with HIC1, in agreement with the fact that HIC1 SUMOylation favors it, and thus highlights a SUMO-SIM non-covalent interaction between these two proteins [11]. However, the region of interaction between HIC1 and MTA1 previously defined by the prey isolated in the yeast two-hybrid screening as MTA1 amino-acids 397-473 excluded this MTA1 SIM motif (Figure 5A) and the HIC1 K314R non-SUMOylatable mutant still interacts with MTA1, albeit weakly [11]. To elucidate this interaction, we constructed another mutant of the full length HIC1 protein, hereafter referred to as HIC1  $\Delta$ MKHEP, by deleting amino acids 305-326 encompassing this SUMOylation motif. In co-immunoprecipitation experiments, the  $\Delta$ MKHEP HIC1 mutant interacts very weakly with ectopically expressed MTA1 proteins as compared to wt HIC1 (Figure 5D, lanes 5 and 6). Furthermore, this deletion mutant upon overexpression in HEK293T cells is almost unable to co-immunoprecipitate with endogenous MTA1 proteins (Figure 5E, lane 2). Reciprocally, we fused the isolated SUMOylation motif of HIC1 (amino acids 305-326) in frame with a C-terminal DNA-binding domain, a nuclear localization signal and an HA epitope in the Gal4-NLS-HA vector to mimic its localization in the full-length protein. However, this 305-326-HIC1-Gal4 chimera despite being nuclear and displaying a strong repression potential in transient Luciferase reporter assays, is unable to significantly interact with MTA1 (data not shown).

All together these results suggest a complex, multi-domain interaction between HIC1 and MTA1 with major, but not exclusive, roles played by the HIC1 SUMOylation motif and the MTA1 SUMO-interacting motif.

*HIC1 interacts with MTA1 in NuRD repressive complexes.*

Methylation-demethylation events at Lysine 532 direct a cyclical and signaling-dependent association of MTA1 with corepressor NURD or coactivator NuRF complexes, respectively [24] (Figure 6A). Indeed, methylation of MTA1 lysine 532 by the histone methyltransferase G9a orchestrates its interaction with the CHD4 ATPase and NuRD repressive complexes [24]. We therefore used a specific G9a inhibitor, Bix-01294, to address the impact of this MTA1 post-translational modification on its interaction with HIC1. Whereas endogenous HIC1 and MTA1 proteins interact in human BJ-Tert fibroblasts [8, 11], this interaction is almost completely abrogated when cells are pretreated with the specific G9a inhibitor, Bix-01294 (Figure 6B). These results suggest that the interaction between HIC1 and MTA1 depends upon MTA1 methylation by G9a occurring in the context of chromatin remodeling and repressive NuRD complexes.

*HIC1 interacts with MTA3.*

MTA1, the closely related MTA2 and the functionally distinct MTA3 proteins are found in a mutually exclusive manner in different specialized NuRD complexes [25, 26]. Given that HIC1 interacts with MTA1 and this interaction is favoured by HIC1 SUMOylation [8, 11], we thus investigated if HIC1 also interacts with MTA3 and if this interaction increased upon induction of non-repairable DSBs. Co-immunoprecipitation experiments (Co-IPs) in transiently transfected HEK293T cells demonstrated that HIC1 interacts with MTA3 and that this interaction strongly increased when cells were pre-treated with etoposide for 16 hours (Figure 7A, lanes 7 and 8).

To correlate these results with promoter occupancy and transcriptional regulation, we next performed ChIP experiments with chromatin prepared from BJ-TERT fibroblasts treated or not with etoposide for 16 hours. Using high quality ChIP-grade antibodies for MTA3 [16], these experiments demonstrated a strong enrichment of MTA3 binding onto the HIC1 responsive elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter [6, 11] upon induction of irreparable damage (Figure 7B). Thus, the increase of HIC1 SUMOylation after a 16 hour etoposide treatment is nicely correlated with an increase in HIC1-MTA3 interaction, thus favoring the recruitment of MTA3 onto HIC1 direct target genes. Taken together, these results demonstrate that HIC1 can interact with the MTA1/MTA2 and MTA3 proteins and hence with a wide variety of NuRD complexes and that these repressive complexes are favoured to repress some HIC1 target genes and notably *SIRT1* during the apoptotic DNA-damage response to non-repairable DSBs.

*A short 6 hour etoposide treatment is sufficient to induce a P53-dependent apoptotic response*

HIC1 directly represses *SIRT1* transcription to modulate the P53-dependent apoptotic response to non-repairable double-strands breaks [6]. Our previous work [8, 11] and the results reported in this study all emphasize an increased HIC1 SUMOylation which favors its interaction with MTA1 or MTA3 in NuRD repressive complexes and hence enhances its transcriptional repression activity during the cellular response to irreparable DSBs (Figures 1 and 5-7). However, a long, 16 hours etoposide treatment could induce a direct transcriptional effect mediated by HIC1 but also an indirect, “second-wave” effect mediated by P53 which is acetylated and hence activated through *SIRT1* inhibition by HIC1. Indeed, in these conditions the pro-apoptotic *Bax*, *Noxa* and *PUMA* genes and the anti-apoptotic *BCL-2* gene which are not direct target genes of HIC1 but direct P53 target genes are activated or repressed, respectively by P53 [6]. To address this issue, we first performed a pilot time-course response of BJ-Tert fibroblasts to etoposide. BJ-TERT cells transfected with Control siRNAs or HIC1 siRNAs were

treated with etoposide for 1, 6 and 16 hours and analyzed by Western blot for expression of the cell cycle inhibitor P21<sup>CIP1</sup> which is a key factor mediating the P53 response and also a direct target gene of HIC1 [27]. A similar induction of P21<sup>CIP1</sup> expression is observed after either 6- or 16- hour etoposide treatments as well as a further increase in siHIC1-treated cells as expected for a HIC1 direct target gene (Figure 8A). Thus, a shorter 6 hour etoposide treatment is sufficient to induce a P53-dependent apoptotic response while limiting the induction of indirect HIC1 target genes.

### *Microarrays analyses*

Given our findings of the important role played by HIC1 SUMOylation in the transcriptional response to irreparable DNA damage, we chose to employ a gene expression profiling approach to identify candidate genes for HIC1-mediated transcriptional repression after the induction of DNA damage. BJTERT cells transfected with either siHIC1 (HIC1<sup>-</sup>) or siScrambled (HIC1<sup>+</sup>) control oligomers were subjected to etoposide induced DNA damage. Western blot analyses confirmed the efficient inactivation of HIC1 by the siRNA as well as the induction of P53 and p21 after etoposide treatment (Figure 8B). Total RNA was isolated from treated and untreated cells in triplicate and subjected to gene expression profiling using the ILLUMINA HumanHT-12 v4 Expression BeadChip kit. To identify potential target genes, two normalization strategies were employed. In the first, HIC1<sup>+</sup> and HIC1<sup>-</sup> etoposide treated cells were first normalized to their untreated counterparts to identify genes that became repressed as a result of DNA damage. In order to determine which of those genes were candidates for SUMO-HIC1 mediated repression, the list of repressed genes in HIC1<sup>-</sup> cells was subtracted from those repressed in HIC1<sup>+</sup> cells yielding 629 genes repressed in a HIC1 replete context and not in the absence of HIC1 (Figure 9A, solid lines; Supplemental Table 1). In the second normalization strategy, mRNA expression from both the HIC1<sup>+</sup> and HIC1<sup>-</sup> BJTERT cells that were treated with

etoposide were compared back to the HIC1 sufficient untreated cells. The transcripts that were significantly repressed in the HIC1<sup>-</sup> context were subtracted from those repressed in the HIC1<sup>+</sup> cells to leave 475 genes whose repression was potentially mediated by HIC1 (Figure 9A, dashed lines; Supplementary Table 2). The agreement between the resulting gene lists was substantial with 319 genes representing the intersection of these gene sets (Figure 9B). It is important to note that these genes likely represent both direct and indirect events associated with HIC1-mediated transcriptional repression. The union of these lists (785 genes) was used to identify interaction maps using Ingenuity Pathway Analysis software. The top canonical pathway mapped by the repressed gene set was “Role of BRCA1 in DNA Damage Response”. Measured by the number of molecules represented, “Cell Death” and “Cell Cycle” were the top cellular functions identified with 80 and 58 genes represented respectively. Thus, we were able to place HIC1 and its interaction with NuRD complexes through its increased SUMOylation among the canonical pathways responsible for the transcriptional response to irreparable DSBs while yielding further potential targets of HIC1 for future validation.

## DISCUSSION

The cellular response to different types of DNA damages involves a complex interplay of various post-translational modifications including phosphorylation by PIKK kinases, Ubiquitinylation, PARylation and SUMOylation among many others [28-30]. SUMOylation is a very dynamic and labile post-translational modification, involved essentially in regulation of protein-protein interaction and organization of macromolecular complexes through SIMs (SUMO-interacting motifs) that allow effector proteins to engage SUMO-modified substrates [12, 31]. Numerous proteins modified by SUMOylation have been identified and many of them are associated with transcriptional repression [31, 32]. It is also becoming increasingly clear that SUMOylation plays key roles in the regulation of DNA damage repair and responses with for example an increased presence of SUMO at sites of DNA damage [28]. SUMOylation is a very labile PTM affecting only a small percentage of target proteins, the so called “SUMO paradox” [12] and is thus difficult to detect. However, thanks to recent major improvements in proteomics techniques the global SUMO proteome has been characterized in various contexts. Notably, a recent study demonstrated that SUMO-2 modification targets a co-regulated group of proteins that includes several chromatin modifiers which cooperate to decrease global transcription upon DNA damage [33]. Therefore, the current study nicely ties together the two major areas of SUMOylation research, the role of SUMOylation in transcriptional repression and its role in the DNA damage response [28, 34].

In this manuscript, we have studied in-depth the SUMOylation of the transcriptional repressor HIC1 in various aspects of the DDR to DSBs as HIC1 has been defined as a new player in DDR [6-8]. Indeed, HIC1 was originally characterized as a tumor suppressor gene facilitating the P53 dependent apoptotic response [4-6]. In that setting, we previously demonstrated an ATM-dependent increase in HIC1 SUMOylation favoring the interaction with MTA1, a core component of NuRD chromatin remodeling complexes [8, 11]. HIC1 is also involved in the

repair of DSBs since BJ-TERT fibroblasts treated for 1 hour with etoposide and siRNAs targeting HIC1 repairs DSBs less efficiently than cells treated with control siRNAs [8]. However, the mechanisms sustaining HIC1's roles in the repair process are still elusive. During repair of DSBs, PIKK kinases regulate chromatin structure at DSBs and in their vicinity to provide a scaffold for recruitment and/or stabilization of repair proteins; to allow chromatin relaxation to promote repair of DNA damages located in condensed heterochromatin and, conversely, to induce transcriptional repression in euchromatin to avoid interference with repair [18].

In stark contrast to its previously described ATM-dependent increase in response to irreparable DSBs induced by a 16 hour etoposide treatment [8], HIC1 SUMOylation remains globally at basal levels when cells are exposed to etoposide for 1 hour to induce repairable damage, even in presence of the ATM inhibitor Ku-56933 (Figure 1). To date the only functions ascribed to HIC1 SUMOylation are to increase the transcriptional repression potential of a HIC1-Gal4 chimera in transient luciferase assays [10] and to enhance the interaction of HIC1 with the corepressor MTA1 [8, 11]. Through the use of a HIC1 mutant stripped of its SUMOylation motif ( $\Delta$ MKHEP) and two MTA1 mutants, the SIM-deficient AAA and non-SUMOylatable K509R [13], we have clearly established that classical non-covalent interactions between a SUMO bound to HIC1 lysine K314 in the conserved MKHEP motif and a canonical SIM (SUMO-Interacting Motif) in MTA1 are the major but not exclusive players in the recruitment of NuRD repressive complexes to HIC1 direct target genes. In addition, we have demonstrated that HIC1 also interacts with MTA3 after a 16 hour etoposide treatment and thus in a SUMOylation-dependent manner.

Even though its SUMOylation levels did not increase, HIC1 can still be SUMOylated when cells are exposed to etoposide for 1 hour. SUMOylation is one of the major post-transcriptional modifications involved in the DNA-damage response with an overall increase of SUMOylated



proteins, for example many of the DNA repair effectors at sites of DNA damage [28]. However, results of the Comet assays performed with the non-SUMOylatable HIC1 E316A strongly argue against a positive role of HIC1 SUMOylation and hence of HIC1-NuRD interactions to inhibit local transcription at DSBs or to repress expression of target genes during the repair process.

Another important issue in the repair process is the salient differences between the kinetics and mechanisms for the repair of DSBs occurring either in open and transcriptionally active euchromatin or in highly compacted and transcriptionally inactive heterochromatin [35, 36]. In fact, the chromatin compaction found in heterochromatin on one hand protects it from DNA damages but on the other hand impairs the repair process once the damage occurs. Therefore, the majority of DSBs in heterochromatin are repaired with slow kinetics through ATM-dependent mechanisms of chromatin “relaxation”, as exemplified by the ATM-mediated phosphorylation of KAP1. KAP1, the obligate co-repressor for KRAB zinc fingers, the largest family of zinc-finger transcription factors, can undergo SUMOylation. KAP1 SUMOylation mediates its interaction with NuRD complexes owing to a SIM motif found in the C-terminal part of the ATP-dependent chromatin remodeling subunit CHD3 [37]. Upon DSBs induction, ATM phosphorylates Serine 804 which is located in a structurally-disordered region of the C-terminal domain of KAP1. Biochemical interaction studies suggested that this phosphorylation in the disordered region of KAP1 produces a SIM-like domain in KAP1 which could interfere with the KAP1-SUMO/SIM-CHD3 interaction thereby causing dispersal of CHD3/NuRD from the DSBs and chromatin relaxation [38, 39]. HIC1 is a transcriptional repressor interacting with four major chromatin and remodeling repressive complexes and thus can contribute to the “heterochromatinization” of some direct target genes such as the cerebellum-specific *ATOH-1* gene in fibroblasts [17, 40]. As for KAP1-CHD3, HIC1 SUMOylation increased the interaction with MTA1/NuRD in part through a SUMO-SIM interaction. However, the HIC1-MTA1 interaction did not vary in repair conditions and comet assays failed to detect any significant

differences in the repair kinetics and efficiency, between wild-type HIC1 and the non-SUMOylatable E316A mutant. Thus, the modulation of HIC1-MTA1 interaction through regulation of SUMO-SIM interaction is unlikely to contribute to DSBs repair through heterochromatin relaxation.

In contrast to the obvious lack of necessity for the cellular response to repairable DSBs demonstrated in this study, HIC1 SUMOylation has previously been shown to be important for the response to irreparable damages [8]. We have further refined this finding by showing that this HIC1 SUMOylation increase is independent of the effector nucleoplasmic kinase, Chk2. Since ATM is stabilized and activated at chromatin, this strongly suggests that HIC1 SUMOylation is important for chromatin organization. Indeed, the HIC1-MTA1 interaction which is favored by HIC1 SUMOylation is totally inhibited when MTA1 Lysine 532 is not methylated. This methylation event represents a molecular switch since methylated and demethylated MTA1 nucleate repressive NuRD or activating NuRF complexes, respectively [24]. As a whole, these results firmly link the increase of HIC1 SUMOylation to a role in the transcriptional repression of target genes to orchestrate the apoptotic DNA damage response. Two key genes in this process are SIRT1 [6] and p21 [27]. To have a more global vision of HIC1 target genes involved in the transcriptional DNA damage response to non-repairable DSBs, we have conducted gene profiling analyses of BJ-TERT fibroblasts with or without HIC1 inactivation by RNA interference and treated or not with etoposide for 6 hours. Our results provide the first list of potential direct and indirect HIC1 target genes in normal human cells with inactivation of endogenous *HIC1* expression. Using a conditional knock-out of the *Hic1* gene, a recent study identified *Hic1* repressed genes but in mouse embryo fibroblasts (MEFs) [41]. But, so far, most of the HIC1 target genes have been identified using ectopic expression of HIC1 through adeno- or retro-viral infection of various HIC1-deficient transformed cell lines [42-45]. The induction of irreparable DSBs by etoposide treatment activates the PIKK kinases,

ATM and DNAPKcs which can phosphorylate and activate or stabilize many substrates including key transcriptional regulators such as P53, thereby modulating the expression of numerous target genes. However, through two thorough normalization strategies we were able to identify genes regulated by HIC1 in an etoposide-dependent manner (Figure 9). In good agreement, with the longstanding role of HIC1 in the P53-dependent apoptotic response [6] and the importance of HIC1 SUMOylation in this process as shown by our previous work [8, 10, 11] and extended in this study, many of these genes are implicated in cell death and cell cycle control.

In conclusion, our work demonstrates that HIC1 SUMOylation is dispensable for DNA DSB repair but essential as a transcriptional repressor for the apoptotic response in the case of irreparable DSBs. Further studies are currently in progress to decipher the functional role of HIC1 in DNA repair. In particular, we are trying to identify potential HIC1 PTMs specifically induced when cells are exposed to repairable DSBs. These analyses would help to better decipher and understand the contribution of HIC1 to the repair process.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Cell lines and Transfection***

Cos-7, HEK293T 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 humidified 5% CO<sup>2</sup> atmosphere.

### ***Plasmids and Chemicals***

The expression vectors for full-length FLAG-HIC1, the non-SUMOylatable FLAG-HIC1 E316A, for His-SUMO2, Myc-MTA1, the non SUMOylatable Myc-MTA1 K509R and SIM-deficient Myc-MTA1 AAA mutants have been described previously [8, 10, 13].

Etoposide and the Chk2 inhibitor C3742 (Chk2 inhibitor II hydrate) were purchased from Sigma-Aldrich. Wortmannin (Calbiochem), a PI3K inhibitor which also inhibits PIKKs and ATM (KU-55933; Santa Cruz Biotechnology) and DNA-PKcs (NU-7441, Selleckchem) inhibitors were dissolved in DMSO and used at a final concentration of 10  $\mu$ M. Inhibitors were added to culture medium 1 hour before subsequent treatments. BIX-01294, a specific inhibitor of the methyltransferase G9a, was purchased from Sigma and used at a final concentration of 1  $\mu$ M.

### **Transfection and co-immunoprecipitation**

Cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the PEI method using ExGen 500 (Euromedex) as previously described with 2.5  $\mu$ g of DNA corresponding to the relevant expression vectors or the empty vector used as control. Cells were transfected for 6h and then incubated in fresh complete medium.

For co-immunoprecipitation analyses (Co-IPs), 48h after transfection, cells were rinsed with cold PBS and lysed in cold IPH buffer (50mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, protease inhibitor cocktail [Roche]). Cell lysates were sonicated briefly and cleared by centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 15 min). The supernatants were pre-cleared with 15  $\mu$ l of protein A/G sepharose beads (Amersham Bioscience) incubating during 1 hour on a rotator at 4°C. Then, lysates were incubated with 2  $\mu$ g of antibody on a rotator at 4°C overnight. Later, 20  $\mu$ l of protein A/G beads were added and incubated 30 min at 4°C. Finally, the beads were

washed three times with IPH buffer. Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer before analyses by SDS/PAGE followed by immunoblotting.

### ***Small Interfering RNA***

HEK293T cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 10 nM small interfering RNA targeting Chk2 (Human CHEK2 siGENOME- SMARTpool M-003256-06-0005, Dharmacon), ATM (Human ATM siGENOME siRNA - SMARTpool M-003201-04-0005, Dharmacon) or a scrambled control sequence (si Ctrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon). For DNA-PKcs (referenced as PRKDC), we prepared a pool with four individual ON-TARGET plus PRKDC siRNAs (LQ-005030-00-0005, Dharmacon). 24 hours after siRNA transfection, cells were transfected with FLAG or FLAG-HIC1 vectors and treated with etoposide 24 hours later as previously described [8].

### ***Comet Assays***

As previously described [8] [14], Cos7 cells were transfected for 48h with expression vectors for wt FLAG-HIC1 or for the non-SUMOylatable point mutant FLAG-HIC1 E316A. For each condition, 2,000 cells were suspended in 80µl 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 (1.2M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton, pH=10) at 4°C, for 90 min in the dark. Comet slides were next placed in a horizontal electrophoresis unit, and let to equilibrate in electrophoresis buffer (Tris 89mM, Boric acid 89mM, EDTA 2mM, pH8 to detect double strand breaks) for 10 min at 4°C, in the dark. After migration (40V for 25 minutes), the slides were

stained with SYBR green (Molecular Probes-1000X) according to manufacturer's recommendations.

### ***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 an internal control [15]. The primers used for the qRT-PCR analyses were for Chk2; oligonucleotide sense 5'-CCCCTGGGCTCGATTATG-3' and antisense 5'-TCCCTCCCAAACCAGTAGTTGT-3', for ATM; oligonucleotide sense 5'-AGATGATGGGAGGCCTAGGA-3' and antisense 5'-ACAAAGTGTGATGGGGGTGA-3'.

### ***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 [8].

Commercial antibodies of the following specificities were used: FLAG M2 from Sigma; Anti MTA1 (sc-9445 for WB and sc-10813 for IP) from Santa Cruz and Anti MTA3 (ab87275) from Abcam;  $\gamma$ H2AX, pS1681ATM, ATM total, DNA-PKcs total, DNA-PKcs (pS2056) from Abcam, Chk2, pS516Chk2, pT68Chk2 pS20P53 and anti-actin antibodies (sc-1616-R) from Santa Cruz Biotechnology.

Western blot analyses were performed as previously described [8]. The secondary antibodies were horseradish peroxidase-linked antibodies against rabbit, rat and mouse immunoglobulins

(Amersham Biosciences); goat immunoglobulins (Southern Biotech). To analyze the SUMOylation of HIC1 proteins by Western blotting analyses, transfected HEK293T cells pelleted by centrifugation were directly lysed in Laemmli loading buffer, boiled for 10 minutes and processed for Western blotting as described above.

### ***Chromatin Immunoprecipitation***

Human BJ-TERT fibroblasts were treated with DMSO or Etoposide for 16 hours, washed with PBS and resuspended in 0.5 ml PBS for  $5 \times 10^6$  cells. Then, cells were fixed by adding formaldehyde to a final concentration of 1% for 8 min at room temperature. To stop fixation, glycine was added to a final concentration of 0.125M. After 5 min at room temperature, cells were collected by centrifugation (1500 rpm, at 4°C, 5 min). The supernatants were removed and we lysed cells by resuspension in chilled cell lysis buffer for 10 min on a rotator at 4°C. Then, the samples were pelleted, resuspended in 200  $\mu$ l nuclei lysis buffer and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a cooling BioRuptor (Diagenode, Belgium). 20  $\mu$ g of chromatin was immunoprecipitated with indicated antibodies and real-time PCR analyses were performed as described [16]. The primers used for *GAPDH* and the *SIRT1* promoter have been previously described [17].

### ***Microarrays analyses***

Total RNA was prepared from BJ-TERT human fibroblasts transfected with siCtrl or siHIC1 and mock-treated (DMSO) or treated with etoposide for 6 hours. Samples were prepared for gene expression microarrays using the Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX). In brief, 200 ng of total RNA for each sample underwent 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> strand cDNA synthesis followed by an in vitro transcription (IVT) amplification that generates biotinylated, antisense RNA copies of each mRNA, referred to as cRNA. For each sample, 750

ng of cRNA was hybridized to a HumanHT-12v4 BeadChip array (Illumina, Inc., San Diego, CA) for 16 hours, followed by washing, blocking, and streptavidin-Cy3 staining according to the Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization protocol (Illumina, Inc., San Diego, CA). The arrays were scanned using an Illumina HiScanSQ System and the resultant image files were analyzed by GenomeStudio™ Gene Expression Module (Illumina, Inc., San Diego, CA). Significance of repression was determined in a comparison context between etoposide treated and null in the HIC1 replete context using an FDR corrected p-value of 0.05 regardless of magnitude.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Ingrid Loison for expert technical help. We are indebted to Pr Rakesh Kumar for the gift of the MTA1 AAA and K509R mutants.

#### **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no disclosure of potential conflicts of interest.

#### **GRANT SUPPORT**

We thank the CNRS, the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC) and the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, Comités de la Somme et du Pas de Calais for their financial support. This work was partially supported by the National Centers for Medical Rehabilitation Research, Molecular and Functional Outcome Measures in Rehabilitation Medicine Core, NIH NCMRR/NINDS 2R24HD050846-06. The authors would like to acknowledge Svetlana Ghimbovshi for her assistance with the microarray data analysis.



## REFERENCES

1. Ciccia A and Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*. 2010; 40: 179-204.
2. Polo SE and Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes and development*. 2011; 25: 409-433.
3. Shiloh Y & Ziv Y The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews*. 2013; 14: 197-210.
4. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ and Baylin SB. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nature medicine*. 1995; 1: 570-577.
5. Rood BR and Leprince D. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013; 17: 811-827.
6. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W and Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*. 2005; 123: 437-448.
7. Dehennaut V and Leprince D. Implication of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) in the DNA damage response. *Bulletin du cancer*. 2009; 96: E66-72.
8. Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C & Leprince D DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288: 10254-10264.
9. Fleuriel C, Touka M, Boulay G, Guerardel C, Rood BR and Leprince D. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2009; 41: 26-33.

10. Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C, Dejean A & Leprince D. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27: 2661-2675.
11. hsC, Boulay G, Pinte S, Stankovic-Valentin N, Guerardel C & Leprince D Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Molecular and cellular biology*. 2010; 30: 4045-4059.
12. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Molecular cell*. 2005; 18: 1-12.
13. Cong L, Pakala SB, Ohshiro K, Li DQ and Kumar R. SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286: 43793-43808.
14. Nassour J, Martien S, Martin N, Deruy E, Tomellini E, Malaquin N, Bouali F, Sabatier L, Wernert N, Pinte S, Gilson E, Pourtier A, Pluquet O and Abbadie C. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nature communications*. 2016; 7: 10399.
15. Boulay G, Malaquin N, Loison I, Foveau B, Van Rechem C, Rood BR, Pourtier A and Leprince D. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287: 5379-5389.
16. Dubuissez M, Loison I, Paget S, Vorng H, Ait-Yahia S, Rohr O, Tsicopoulos A and Leprince D. PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4+ T cell activation. *Molecular and cellular biology*. 2016; in press
17. Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O and Leprince D. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287: 10509-10524.

18. Sirbu BM and Cortez D. DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5: a012724.

19. Gareau JR and Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews Mol Cell Biol*. 2010; 11: 861-871.

20. Caron P, Choudjaye J, Clouaire T, Bugler B, Daburon V, Aguirrebengoa M, Mangeat T, Iacovoni JS, Alvarez-Quilon A, Cortes-Ledesma F and Legube G. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell reports*. 2015; 13: 1598-1609.

21. Hill R and Lee PW. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell cycle*. 2010; 9: 3460-3469.

22. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J and Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology*. 2003; 5: 255-260.

23. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P and Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281 16117-16127.

24. Nair SS, Li DQ and Kumar R A core chromatin remodeling factor instructs global chromatin signaling through multivalent reading of nucleosome codes. *Molecular cell*. 2006; 49: 704-718.

25. Manavathi B, Singh K and Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nuclear receptor signaling*. 2007; 5: e010.

26. Dege C and Hagman. J Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and T-lymphocyte development and function. *Immunological reviews*. 2014; 261: 126-140.

27. Dehennaut V, Loison I, Boulay G, Van Rechem C and Leprince D. Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochemical and biophysical research communications*. 2013; 430: 49-53.
28. Jackson SP and Durocher D. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Molecular cell*. 2013; 49: 795-807.
29. Goodarzi AA and Jeggo PA. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics*. 2013; 82: 1-45.
30. Dantuma NP and van Attikum H. Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the DNA damage response. *The EMBO journal*. 2016; 35: 6-23.
31. Hay RT. Decoding the SUMO signal. *Biochemical Society transactions*. 2013; 41: 463-473.
32. Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT and Sharrocks AD. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell cycle*. 2003; 2: 528-530.
33. Hendriks IA, Treffers LW, Verlaan-de Vries M, Olsen JV and Vertegaal AC. SUMO-2 Orchestrates Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Cell reports*; S2211-1247: 00179-5.
34. Hendriks IA and Vertegaal AC SUMO in the DNA damage response. *Oncotarget*. 2015; 6: 15734-15735.
35. Cann KL and Dellaire G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and cell biology*. 2011; 89: 45-60.
36. Goodarzi AA and Jeggo PA. The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *International journal of molecular sciences*. 2012; 13: 11844-11860.

37. Goodarzi AA, Kurka T and Jeggo PA. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nature structural & molecular biology*. 2011; 18: 831-839.
38. Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J and Shiloh Y. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature cell biology*. 2006; 8: 870-876.
39. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M and Jeggo PA. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell*. 2008; 31: 167-177.
40. Briggs KJ, Corcoran-Schwartz IM, Zhang W, Harcke T, Devereux WL, Baylin SB, Eberhart CG and Watkins DN. Cooperation between the Hic1 and Ptch1 tumor suppressors in medulloblastoma. *Genes & development*. 2008; 22: 770-785.
41. Janeckova L, Pospichalova V, Fafilek B, Vojtechova M, Tureckova J, Dobes J, Dubuissez M, Leprince D, Baloghova N, Horazna M, Hlavata A, Stancikova J, Sloncova E, et al. HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF-kappaB Signaling and Promotes Tissue Damage-Associated Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2015; 13: 1139-1148.
42. Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, Ramsey K, Monte D, Begue A, Tschan MP, Stephan DA and Leprince D. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284: 20927-20935.
43. Zhang W, Zeng X, Briggs KJ, Beaty R, Simons B, Chiu Yen RW, Tyler MA, Tsai HC, Ye Y, Gesell GS, Herman JG, Baylin SB and Watkins DN. A potential tumor suppressor role for Hic1 in breast cancer through transcriptional repression of ephrin-A1. *Oncogene*. 2010; 29: 2467-2476.

44. Zheng J, Wang J, Sun X, Hao M, Ding T, Xiong D, Wang X, Zhu Y, Xiao G, Cheng G, Zhao M, Zhang J and Wang J. HIC1 modulates prostate cancer progression by epigenetic modification. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 1400-1410.

45. Cheng G, Sun X, Wang J, Xiao G, Wang X, Fan X, Zu L, Hao M, Qu Q, Mao Y, Xue Y and Wang J. HIC1 silencing in triple-negative breast cancer drives progression through misregulation of LCN2. *Cancer research.* 2013; 74: 862-872.

## LEGENDS

**Fig. 1. Repairable DNA double-strand breaks (DSBs) induced by a 1 hour etoposide treatment do not lead to an ATM-dependent increase of HIC1 SUMOylation.**

**A)** Etoposide-induced non-repairable DSBs lead to an increase of HIC1 SUMOylation. HEK293T cells were transfected with the indicated combination of empty FLAG, FLAG-HIC1, SENP2 and SUMO2 expression vectors. 32 hours after transfection cells were incubated for 16 hours with 20 $\mu$ M etoposide (+) or DMSO (-) as control before direct lysis in denaturing conditions. Total cell extracts were analyzed by Western Blotting (WB) using the indicated antibodies. **B)** HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide or DMSO for 1 hour. Transfected cells were incubated with or without 5 $\mu$ M of an ATM specific inhibitor (ATMi: KU-55933 also dissolved in DMSO) 1 hour before etoposide treatment, as indicated. Cell extracts were prepared as described in panel A) and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. **C)** HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide or DMSO for 1 hour. Transfected cells were pre-treated or not with the following inhibitors (Wortmannin; ATMi, ATM inhibitor and DNAPKcsi, DNA-PK inhibitor) 1 hour before etoposide treatment, as indicated. Cell extracts were prepared as described in panel B) and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. **D)** HEK293T cells were co-transfected with the indicated combinations of expression vectors for FLAG-HIC1 and

MTA1 and then incubated for 1 hour in etoposide or with DMSO as control. After lysis in IPH buffer, cells extracts were co-immunoprecipitated with anti-HIC1 antibodies. The immunoprecipitates as well as 2% of the whole cell extract (Input) were analyzed by Western blotting with the anti FLAG and anti MTA1 antibody. Note that the MTA1 antibodies detect a doublet of endogenous proteins in non transfected cells whereas the ectopically expressed MTA1 protein co-migrates with the upper band of the doublet (arrowheads).

**Fig. 2. HIC1 SUMOylation is not required for efficient DSBs repair.**

**A)** Cos7 cells were transfected for 48 hours with wt FLAG-HIC1 or with the non-SUMOylatable E316A point mutant. Cells were either mock-treated with DMSO (-) or treated with 20  $\mu$ M etoposide (+) for 1 hour. After removal of the drug, cells were allowed to recover in normal medium for various times (2, 4, 6 and 24 hours) and subjected to neutral Comet assays monitoring DSBs. The percentage of Comet positive cells reflecting the unrepaired DNA breaks is depicted after counting at least 100 cells in each condition. The error bar indicates mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (NS: not significant).

**B)** Representative Comet images of mock-treated (DMSO) and of cells treated with etoposide for 1 hour with or without recovery in normal medium for 4 and 24 hours, respectively.

**C)** Western blot analyses. Samples of cells in each condition were taken before the Comet assays and immediately lysed in Laemmli loading buffer. These whole cell extracts were analyzed by Western blot with anti-FLAG antibodies to detect HIC1 and its SUMOylated forms.  $\gamma$ H2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively.

**Fig. 3. The SUMOylation increase of HIC1 upon induction of irreparable DSBs is dependent on ATM but independent of DNA-PKcs.**

HEK293T cells were transfected either with nontargeted control siRNA (siCtrl), either with a pool of four siRNAs targeting ATM (siATM) or with a pool of four siRNAs targeting DNAPKcs (siDNAPKcs). The next day, these cells were transfected with a FLAG-HIC1 expression vector for 24 hours and were then treated with 20  $\mu$ M etoposide (+) or mock-treated with DMSO (-) as control for 16 hours before direct lysis in denaturing conditions. Total cell extracts were analyzed by Western Blotting (WB) using the indicated antibodies.

**Fig. 4. The increase of HIC1 SUMOylation upon irreparable DSB induction by etoposide requires ATM but not its effector kinase Chk2.**

(A) HEK293T cells were transfected with the FLAG and FLAG-HIC1 vectors. 48 hours after transfection, cells were pre-incubated or not with the Chk2 inhibitor (Chk2i) for 1 hour and then with etoposide for 16 hours as indicated. Cell extracts were prepared and Western blotting was performed with the indicated antibodies. \* refers to non-specific bands detected by the anti pS516Chk2 (autophosphorylation) and by the anti pS20P53 (Chk2 target) antibodies.  $\gamma$ H2AX and actin levels were used as controls for DSBs induction and equal loading, respectively. (B) HEK293T cells grown in normal medium were transfected with siRNA control (siCtrl) or with a Chk2 siRNA pool (siChk2). Total RNAs were extracted and the mRNA expression levels of *Chk2* were assessed by qRT-PCR. Values were normalized to *18S*. (C) Western blot showing efficient siRNA knockdown of Chk2. HEK293T cells were transfected as described in panel B. Total cell extracts were analyzed by Western blotting with anti-Chk2 antibodies (D) HEK293T cells were transfected either with non-target control siRNA (siCtrl) or with a Chk2 siRNA pool (siChk2) before being transfected with the indicated combination of FLAG, FLAG-HIC1 and



SUMO-2 expression vectors. Cells were either incubated with DMSO (-) or with 20  $\mu$ M etoposide (+) for 16 hours. Total cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. \* refers to a non-specific band detected by the anti pS516Chk2, used as a control for Chk2 kinase activity.  $\gamma$ H2AX and actin levels were used as controls for DSBs induction and equal loading, respectively.

**Fig. 5. At least two domains in the C-terminal end of MTA1 are implicated in the interaction with HIC1.**

(A) Schematic drawing of the human MTA1 protein. The domains identified in MTA1 include the BAH (Bromo-associated homology), the ELM (Egl-27 and MTA1 homology), the SANT (SW13, ADA2, N-CoR and TF1118) and the GATA-like zinc finger. The region isolated in the two-hybrid screen with HIC1 is shown with the two first cysteines of the GATA zinc finger not present in the isolated prey, shown as lower-case letters underlined [11]. The Lysine 509, which is SUMOylated, and the C-terminal SIM motif are also shown with the hydrophobic core, IVI, underlined and the flanking acidic residues in bold [13].

(B) The SIM (SUMO-interacting motif) in the C-terminal end of MTA1 is required for its interaction with HIC1. After transfection with the indicated expression vectors, HEK293T cells lysates were immunoprecipitated with anti-c-myc antibodies. Immunoprecipitated samples [IP c-myc (MTA1)] and 1% of whole cell extracts (Input) were analyzed by immunoblotting with anti-HIC1 antibodies to detect co-immunoprecipitation. To control for IP efficiency, the membrane was stripped and probed with anti-MTA1 antibodies (the arrow head indicates a remnant of the HIC1 band). (C) SUMOylation of MTA1 on Lysine K509 is not required for the HIC1-MTA1 interaction. A similar experiment was performed in HEK293T with expression vectors for wt MTA1 or its non-SUMOylatable version (K509R) and HIC1. In the top panel, \*

refers to a non-specific band detected. In the bottom panel, the arrowhead indicates a remnant of the MTA1 band. **(D)** The HIC1-MTA1 interaction is also strongly reduced by deletion of the HIC1 SUMOylation motif,  $\Delta$ MKHEP. A similar Co-IP experiment was realized in HEK293T but with expression vectors for the wt FLAG-HIC1 or the FLAG-HIC1  $\Delta$ MKHEP deletion mutant and wt MTA1. **(E)** Interaction of wt and  $\Delta$ MKHEP HIC1 with endogenous MTA1 proteins in HEK293T cells. Total extracts of HEK293T transfected with the indicated plasmids were analysed by Co-IP with anti-FLAG antibodies and immunoblotted with MTA1 and FLAG antibodies. Note that the endogenous MTA1 proteins in the immunoprecipitated materials or in the Inputs migrate as a doublet.

**Fig. 6. Endogenous HIC1 proteins in BJ-TERT fibroblasts interact with MTA1 in NuRD repressive complexes.**

**(A)** Methylation-demethylation events on MTA1 Lysine 532 direct its association with NuRF co-activator complexes or NuRD repressor complexes. Methylation of MTA1 Lysine 532 by the histone methyltransferase G9a favors its interaction with the ATPase CHD4, a component of NuRD repressive complexes. By contrast, when demethylated by LSD1, MTA1 interacts with NuRF co-activator complexes [24]. Bix-01294 is a specific inhibitor of G9a. **(B)** Endogenous HIC1 and MTA1 proteins in BJ-TERT interact in NuRD repressive complexes. Solubilised chromatin fractions were prepared in duplicate from the same number of BJ-TERT fibroblasts and 1% was retained for direct analyses by Western blot (Input). The interaction between HIC1 and MTA1 was evaluated by co-immunoprecipitation assays with anti MTA1 antibodies or normal IgG as controls in cells pre-treated or not with the Bix-01294 inhibitor for 1 hour.

**Fig.7. Irreparable DSBs induced by a 16 hour etoposide treatment lead to an increased interaction of MTA3 with HIC1 and favor its recruitment to the HIC1-response elements in the *SIRT1* promoter.**

**A)** Etoposide-induced non-repairable DSBs lead to an increase of MTA3 interaction with HIC1. HEK293T cells were transfected with the indicated combination of empty FLAG, FLAG-HIC1, and FLAG-MTA3 expression vectors. 32 hours after transfection cells were incubated for 16 hours with 20  $\mu$ M etoposide (+) or with DMSO (-) as control. After lysis in IPH buffer, cell extracts were co-immunoprecipitated with anti-MTA3 antibodies. The immunoprecipitates as well as 1% of the whole cell extracts were analyzed by SDS/PAGE and transferred to membranes. Relevant pieces of the membranes were cut and analyzed by Western blot with anti-FLAG antibodies to detect MTA3 and HIC1.  $\gamma$ H2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively. **B)** Etoposide-induced irreparable DSB lead to an increase of MTA3 recruitment on the HiRE in the *SIRT1* promoter. Chromatin was prepared from BJ-TERT fibroblasts mock-treated with DMSO or treated with 20mM etoposide for 16 hours to induce irreparable DSB and ChIP experiments were performed with antibodies against MTA3 or rabbit IgG. The bound material was eluted and analysed by quantitative PCR using primers flanking the HIC1-responsive elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter [6], as previously described [17]. *GAPDH* was used as a nonbinding control.

**Fig. 8. A 6-hours etoposide treatment is sufficient to induce p21<sup>CIP1</sup> expression in BJ-TERT fibroblasts.**

(A) Increased expression of P21<sup>CIP1</sup> after various etoposide treatments. BJ-TERT fibroblasts were transfected with control siRNAs (siCtrl) or siRNAs targeting HIC1 (siHIC1) for 48 hours before the induction of DSBs by 80  $\mu$ M etoposide treatments of either 1 hour to induce

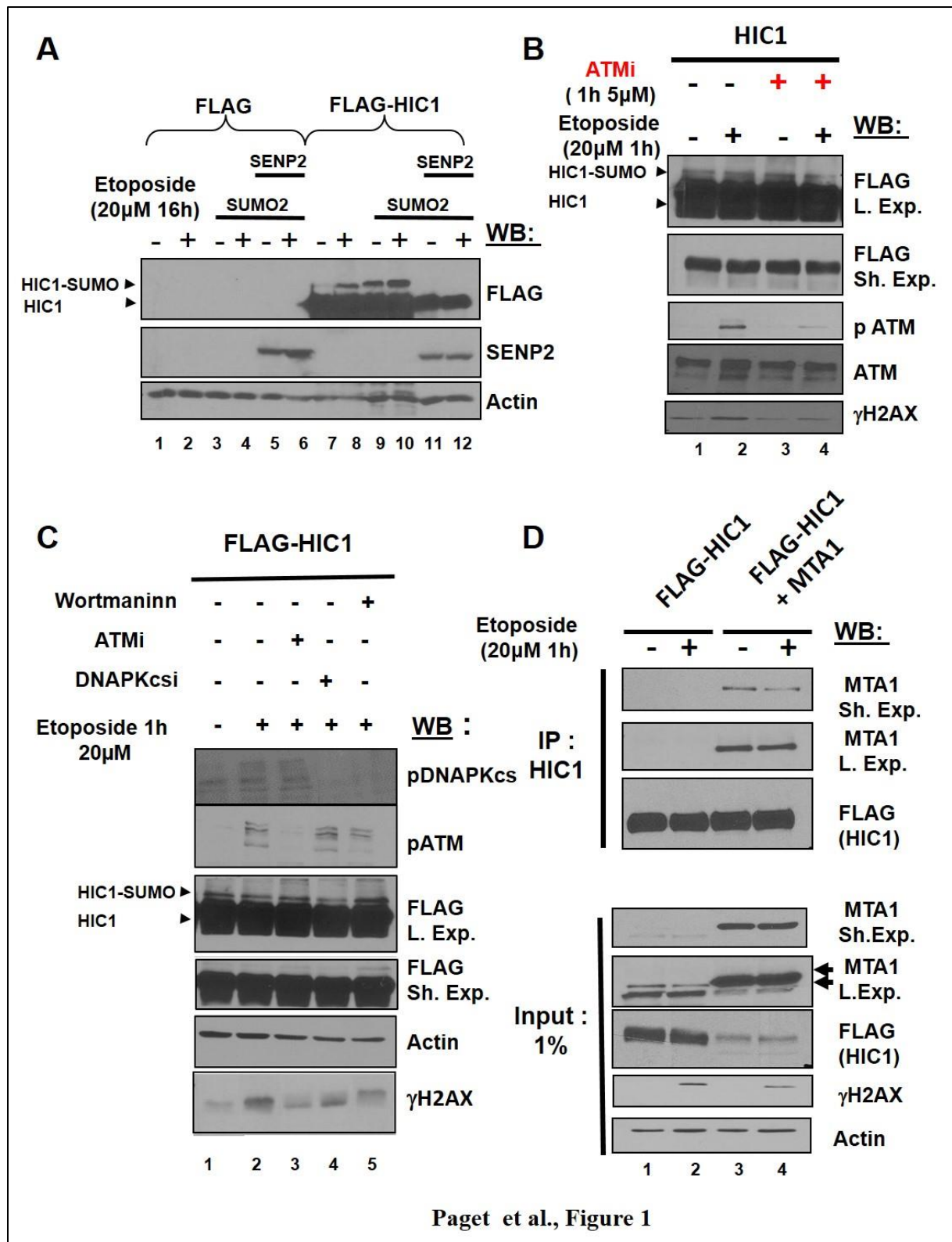
repairable DSBs, of 16 hours to induce a full P53 apoptotic response [6] or of 6 hours, as an intermediate time to favor the induction of HIC1 direct target genes whilst limiting the induction of P53 direct target genes. D corresponds to cell treated for 16 hours with vehicle (DMSO) alone. Total cell extracts were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

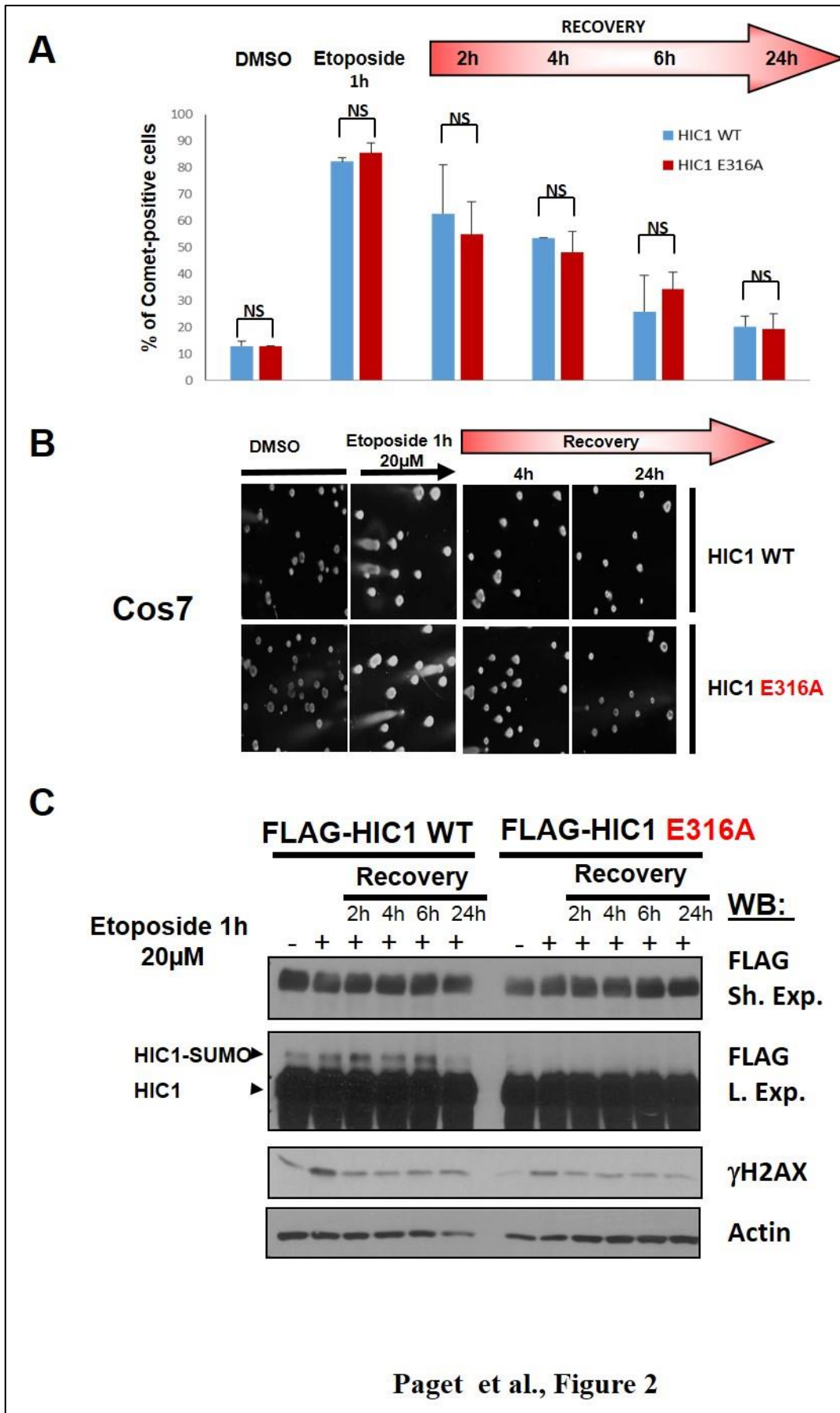
**(B)** Validation of the cell populations used in the microarrays analyses. BJ-TERT fibroblasts (x 100 mm plates) were transfected with siCtrl or siHIC1 and treated for 6 hours with DMSO (-) or etoposide. Total RNAs were extracted for gene expression profiling experiments. As control, aliquots of cells in each condition were directly lysed in Laemmli buffer and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

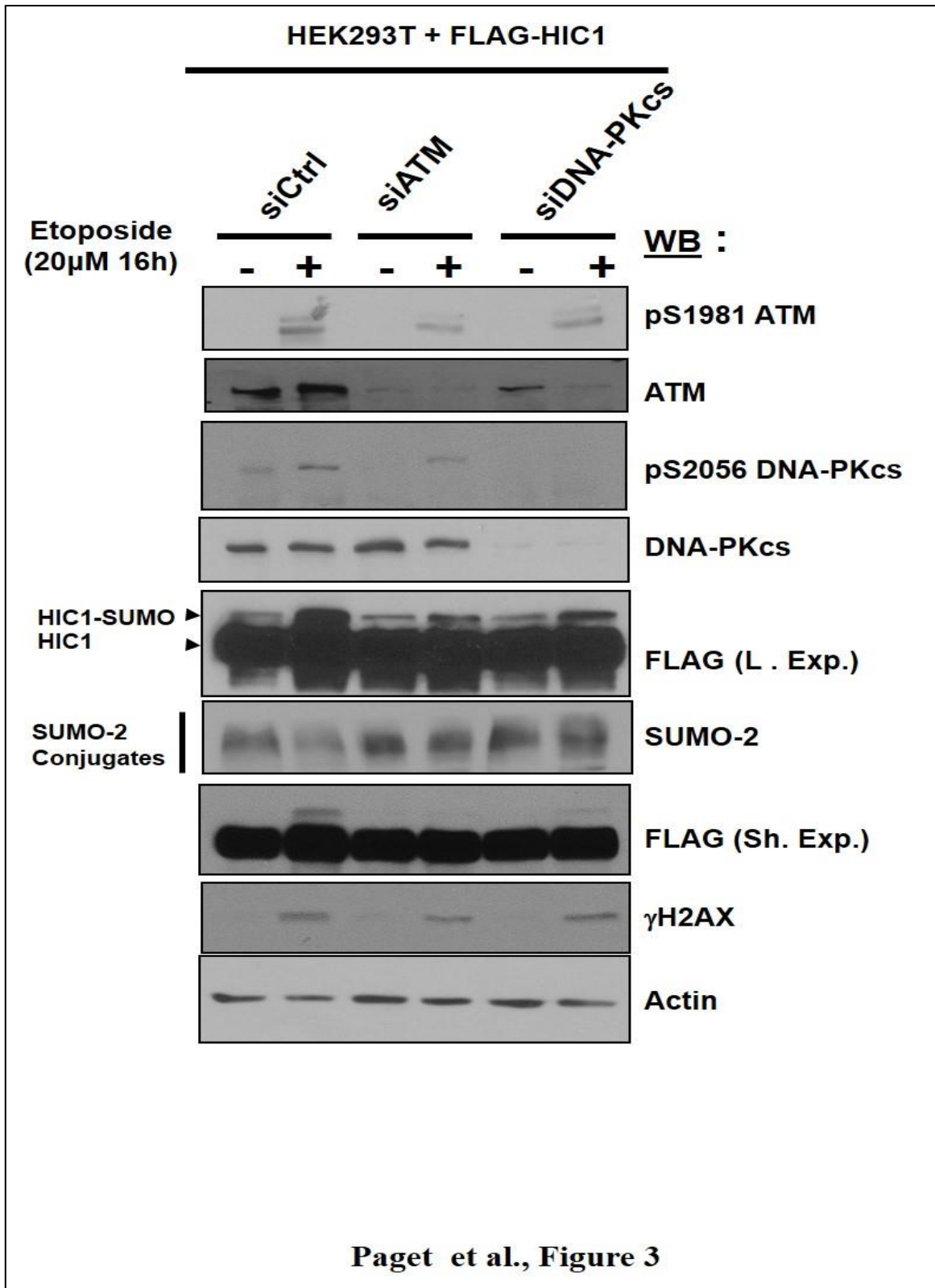
**Fig. 9. Identification of the genes regulated in BJ-TERT human fibroblasts by HIC1 in the presence and absence of etoposide to induce irreparable DSB.**

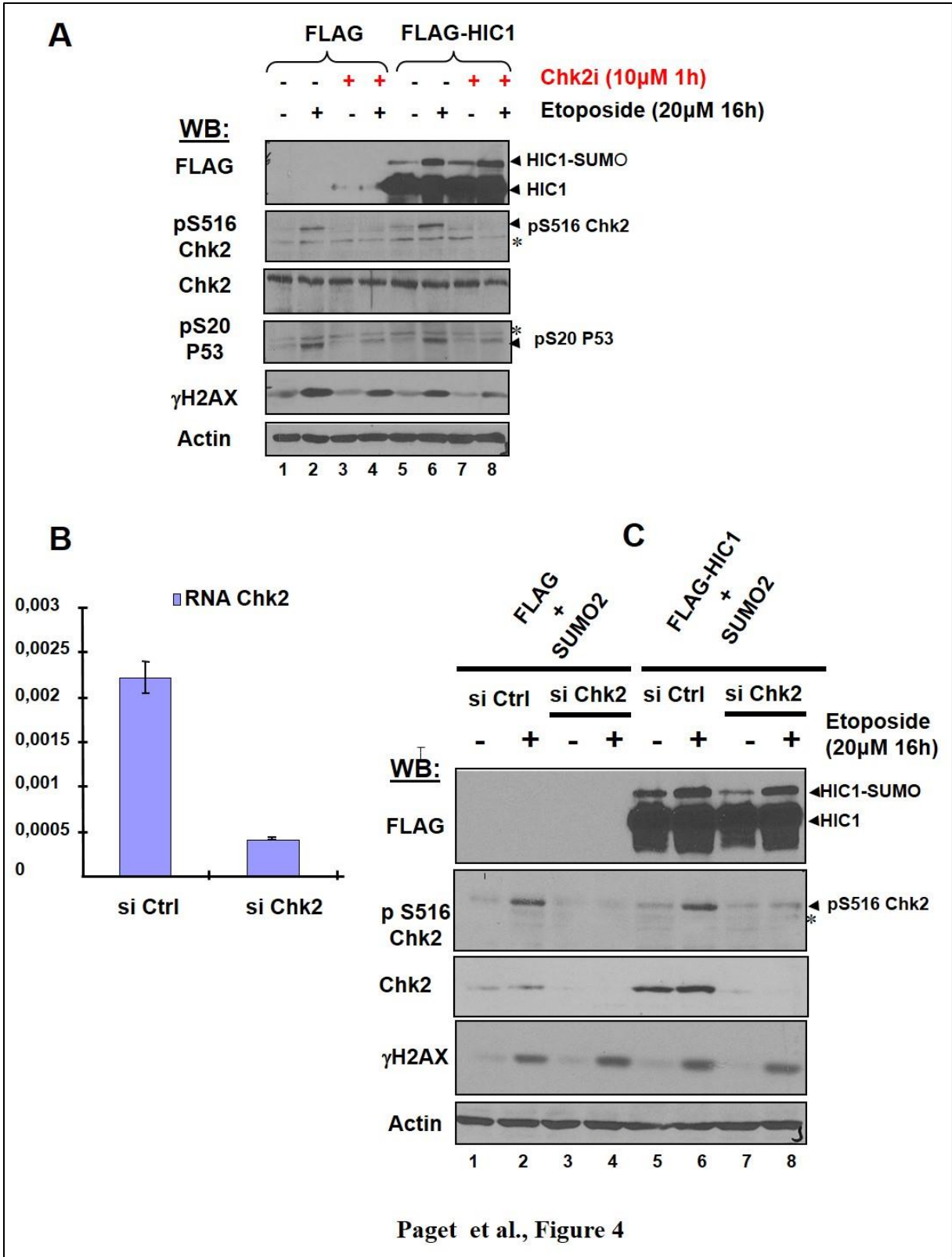
A) Schematic drawing of the experimental design of the study and of the 2 normalization strategies used to identify the genes regulated by HIC1 in the presence and absence of a 6 hour etoposide treatment to induce irreparable DSBs. Subtracting [b] from [a] yields target genes repressed in response to DSBs and dependent upon HIC1 SUMOylation

B) Venn diagrams showing the overlap of target genes from the 2 normalization strategies used (see text for detail).

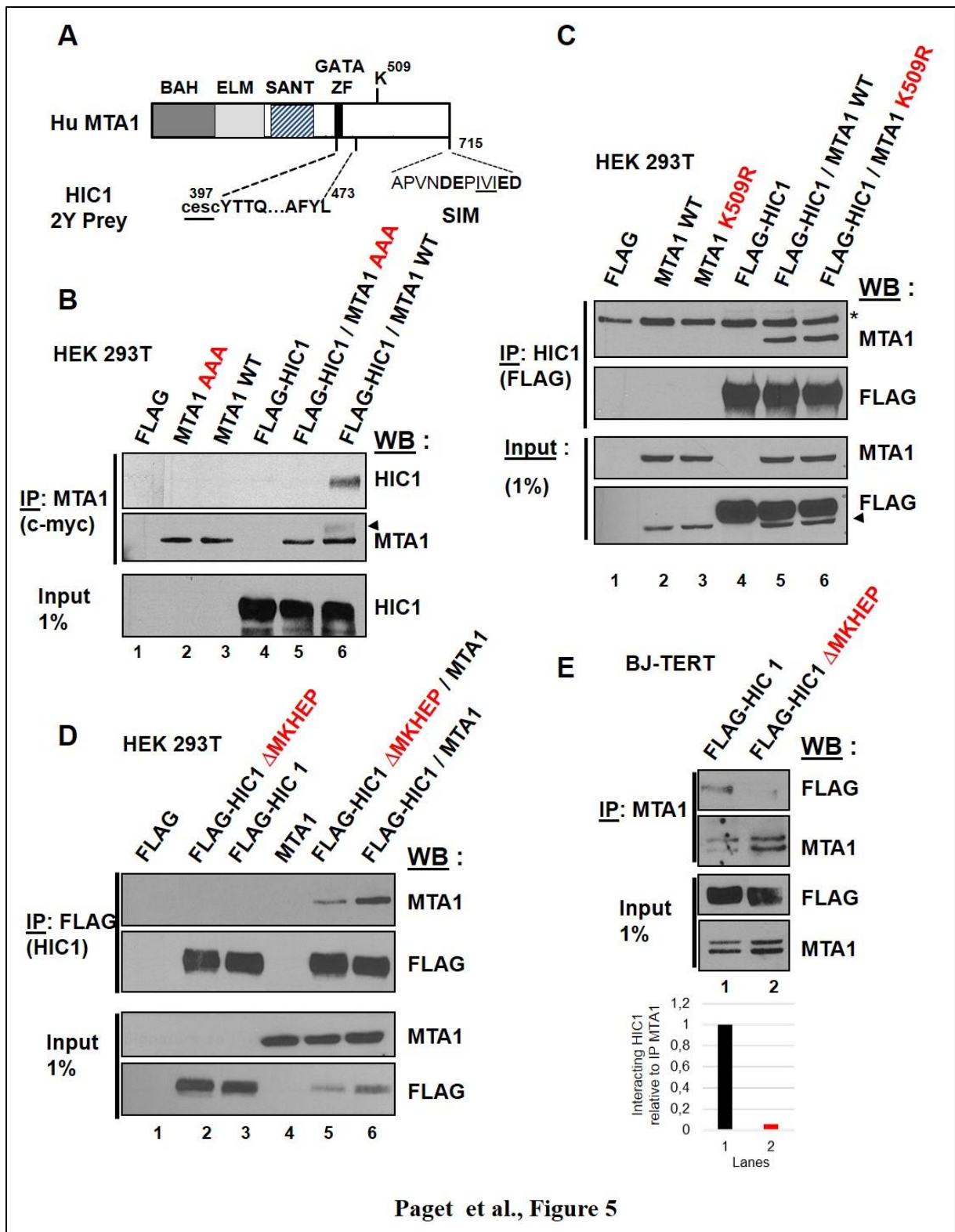


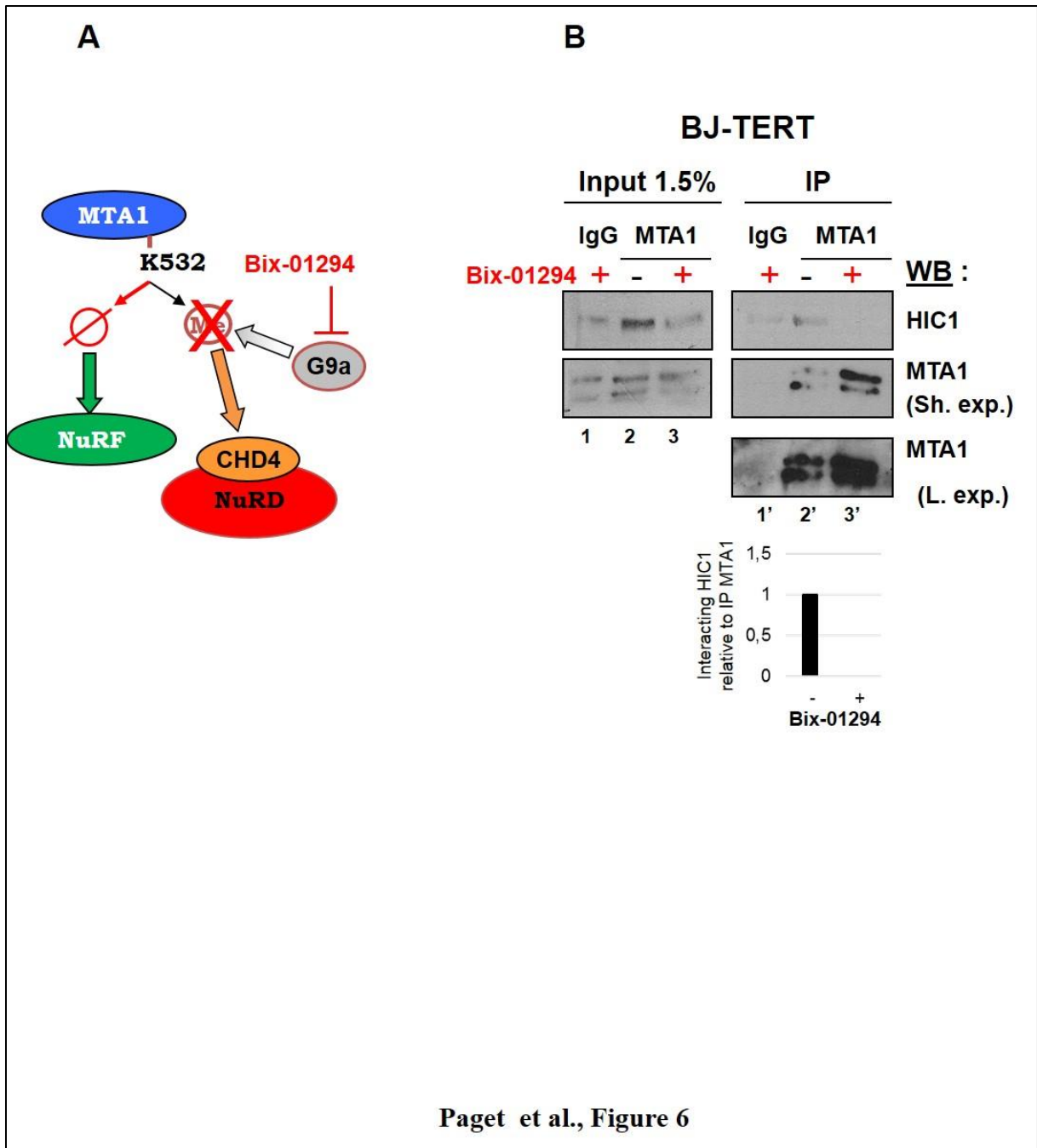




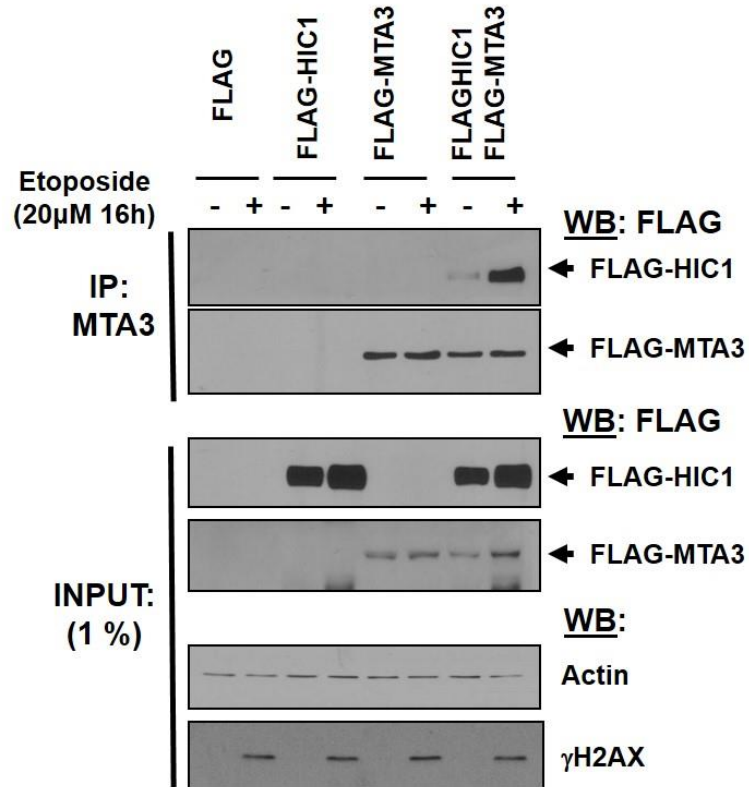




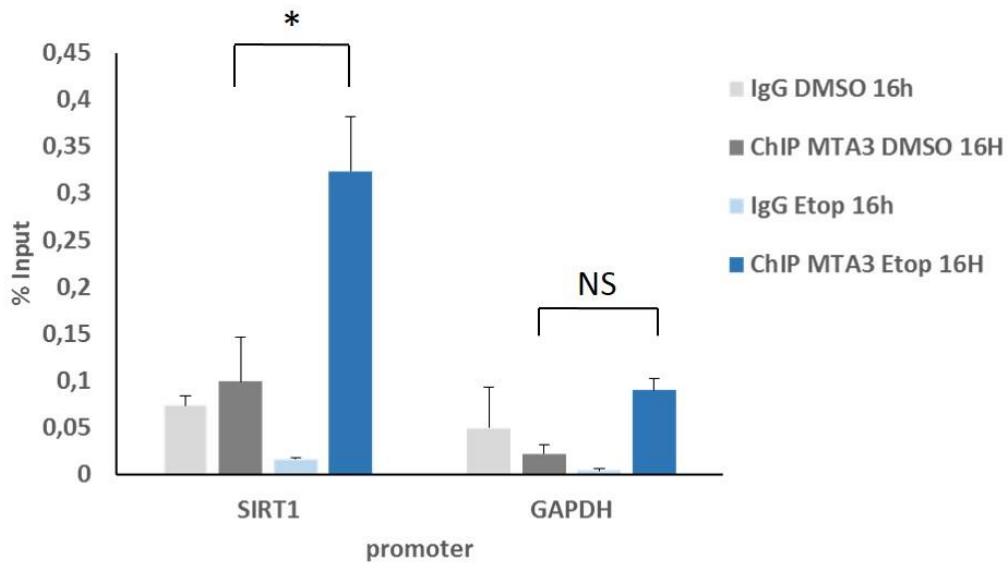




**A**



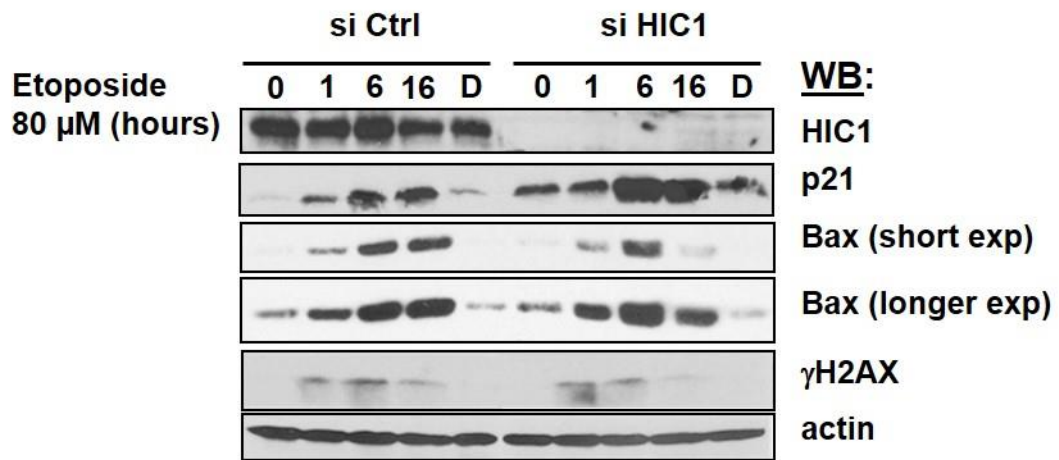
**B**



Paget et al., Figure 7

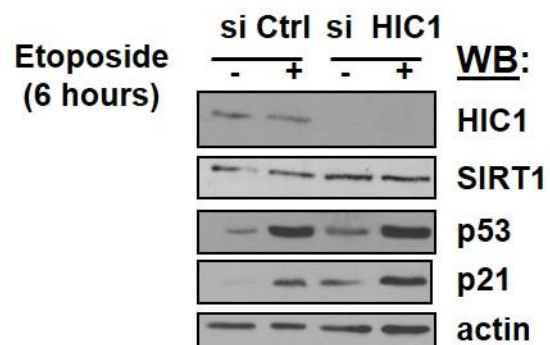
**A**

**BJ-TERT**

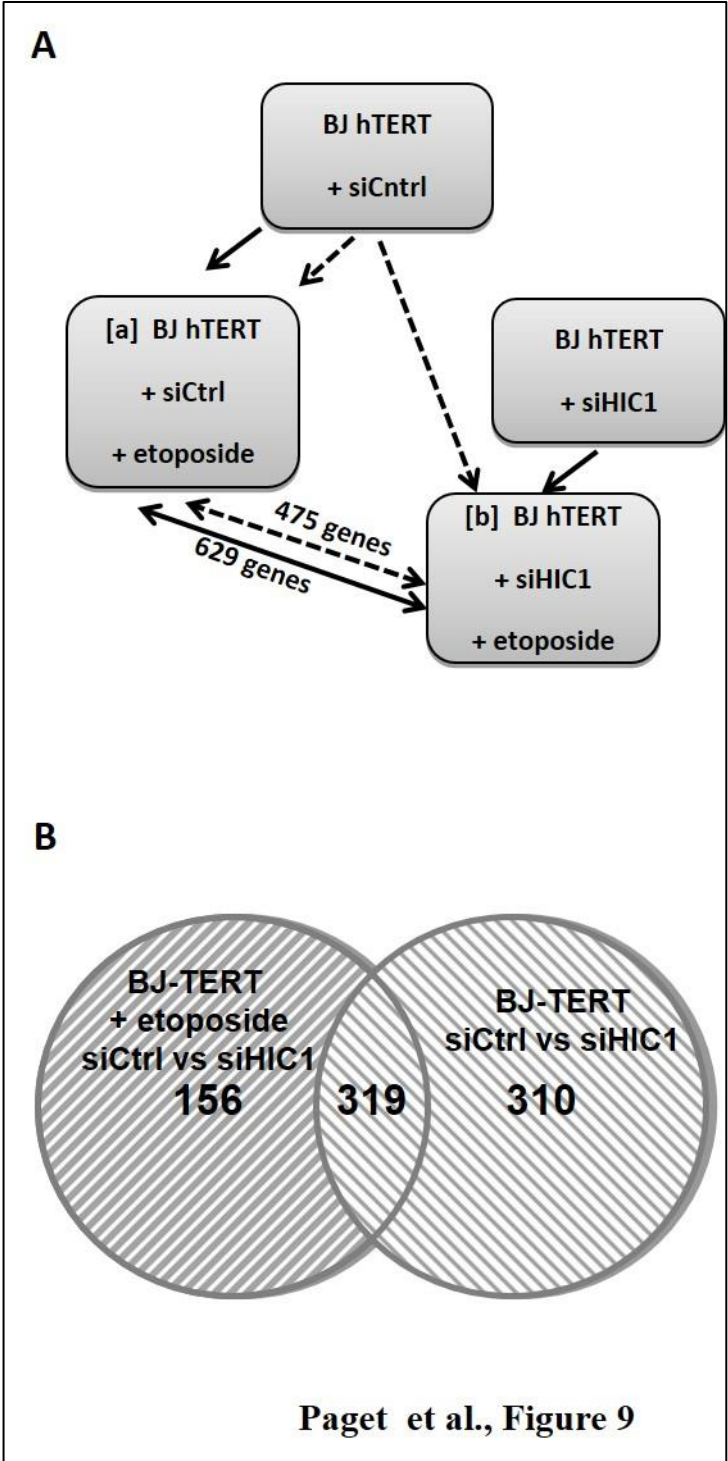


**B**

**BJ-TERT**



**Paget et al., Figure 7**



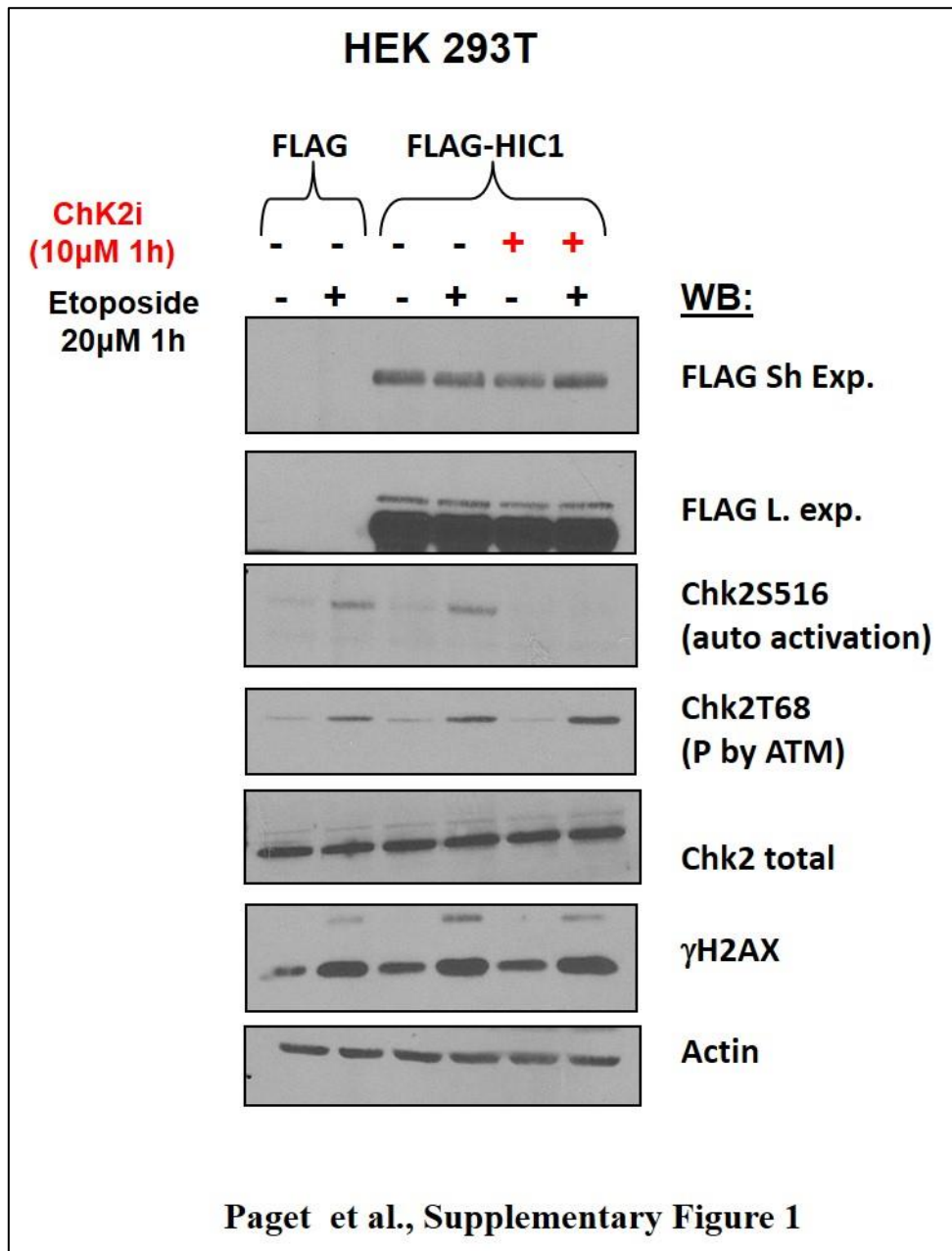
## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

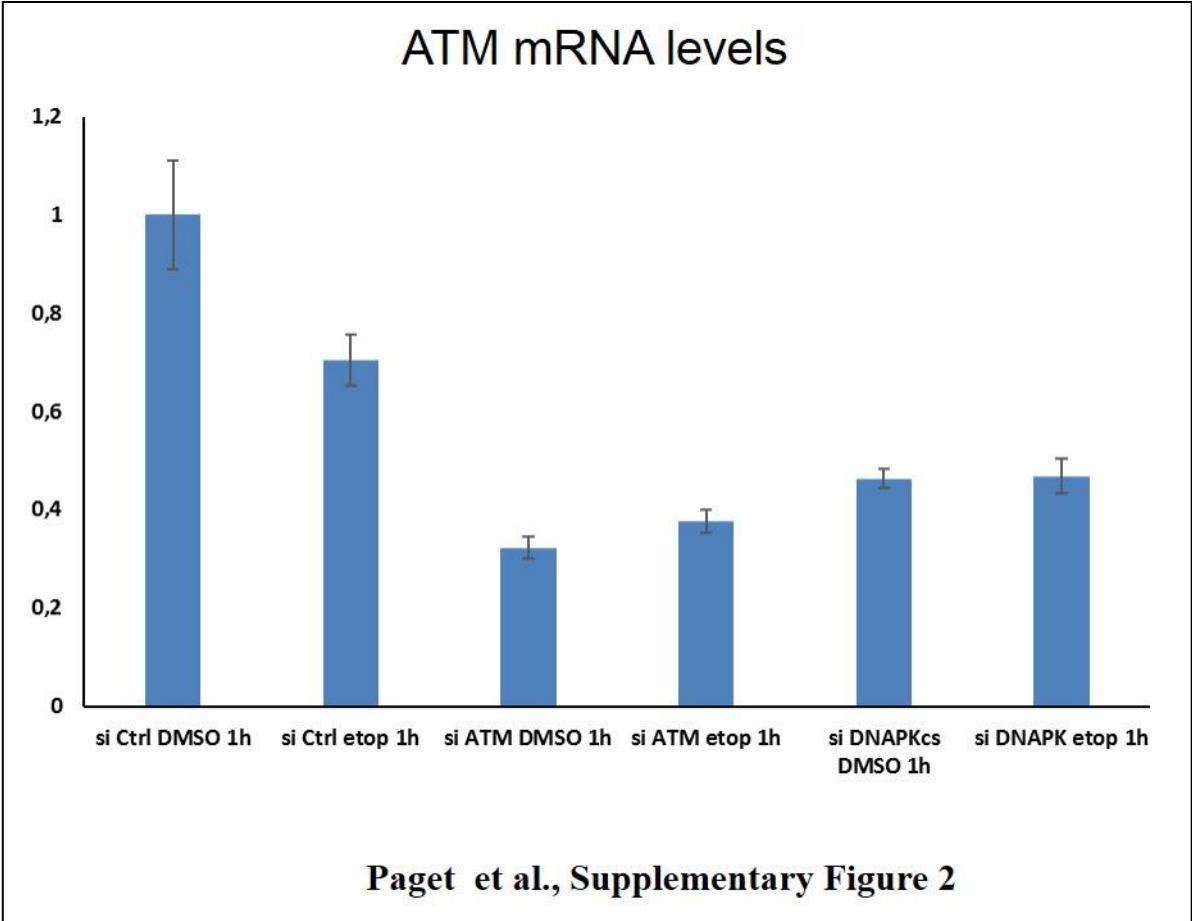
**Supplementary Figure 1 (related to Figure 3):** RT-qPCR analyses of ATM expression levels in HEK293T cells treated with etoposide for 16 hours after transfection with HIC1 and the indicated siRNAs.

HEK293T cells were transfected either with non-targeted control siRNA (siCtrl), either with a pool of four siRNAs targeting ATM (siATM) or with a pool of four siRNAs targeting DNAPKcs (siDNAPKcs). The next day, these cells were transfected with a FLAG-HIC1 expression vector for 24 hours and were then treated with 20  $\mu$ M etoposide (+) or mock-treated with DMSO (-) as control for 16 hours. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression level of ATM

**Supplementary Figure 2 (related to Figure 4):** The Chk2 inhibitor does not affect HIC1 SUMOylation levels in the presence of repairable DNA double-strand breaks (DSBs) induced by a 1hour etoposide treatment.

HEK293T cells were transfected with the FLAG and FLAG-HIC1 vectors. 48 hours after transfection, cells were pre-incubated or not with the Chk2 inhibitor (Chk2i) for 1 hour and then with etoposide for 1 hour as indicated. Cell extracts were prepared and Western blotting was performed with the indicated antibodies. gH2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively.

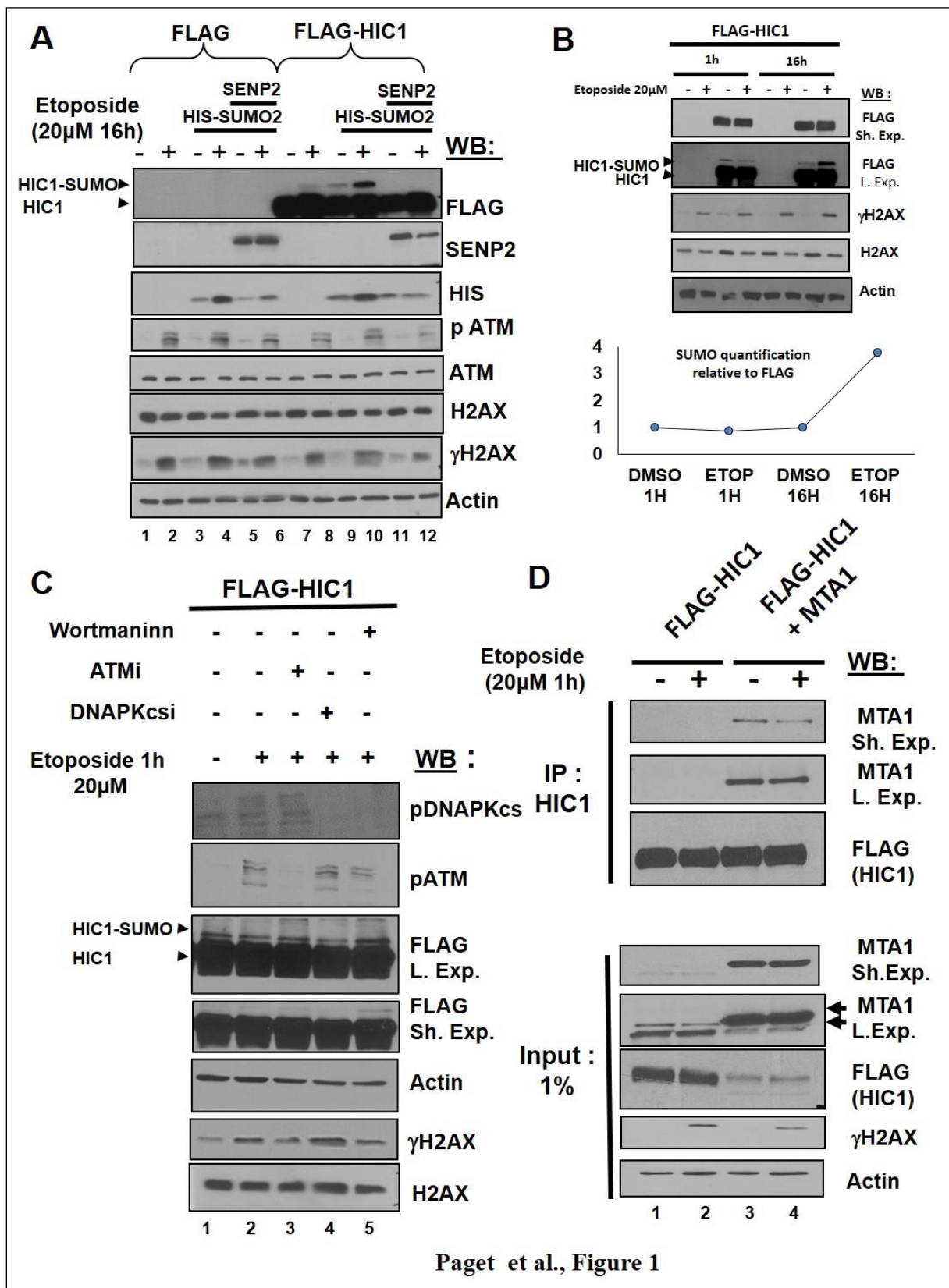






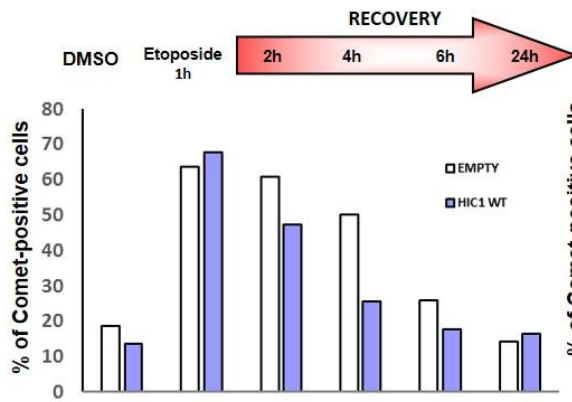
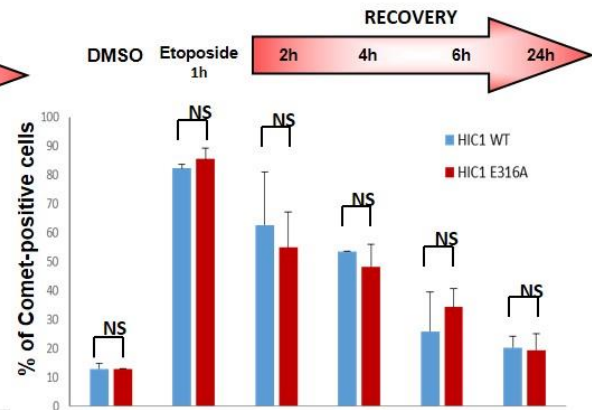
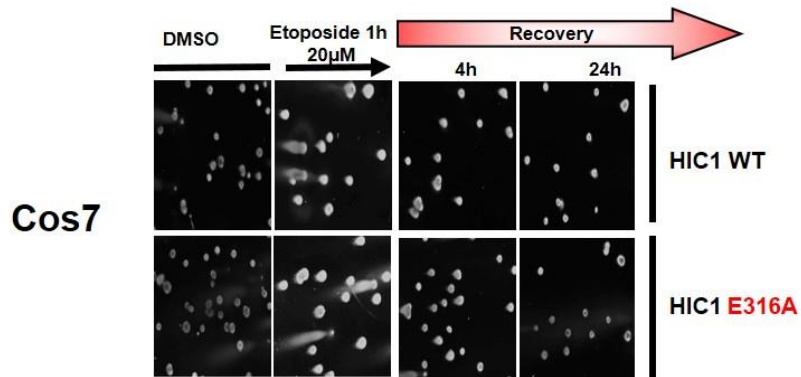
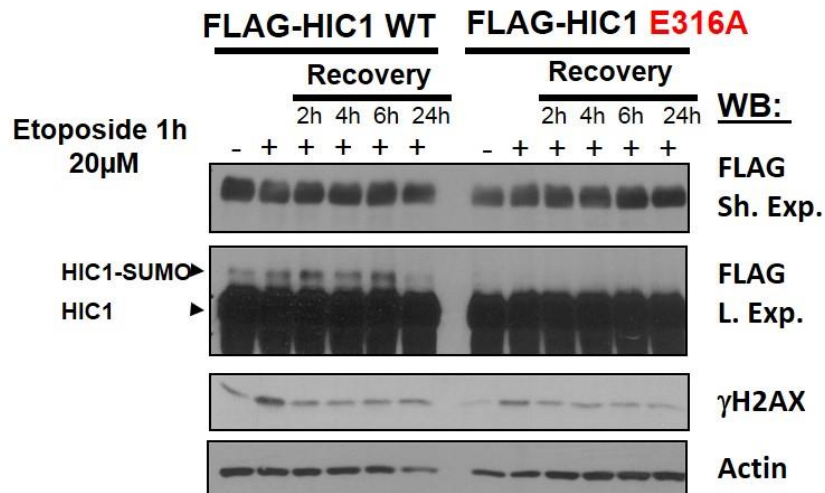
## **Expériences réalisées ou en cours pour la version révisée de l'article soumis au journal Oncotarget**

Certaines figures existantes ont été améliorées et de nouveaux résultats ont été obtenus pour répondre aux critiques et commentaires des reviewers. De façon générale, nous avons ajouté de nombreux contrôles dans les différentes expériences de Western blot lorsque les échantillons protéiques étaient encore disponibles. Dans le cas contraire, certaines expériences ont été refaites entièrement puisque nous ne disposions plus des échantillons protéiques. Nous avons également quantifié le niveau d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 dans les différentes expériences afin de faciliter la compréhension du message final. Nous avons également effectué de nouvelles expériences de ChIPqPCR pour renforcer nos résultats précédant. Pour finir, nous avons supprimé l'ancienne figure 6 qui complexifiait la compréhension de l'article dans son ensemble. Seules les nouvelles expériences seront détaillées entièrement.



### **Figure 1 :**

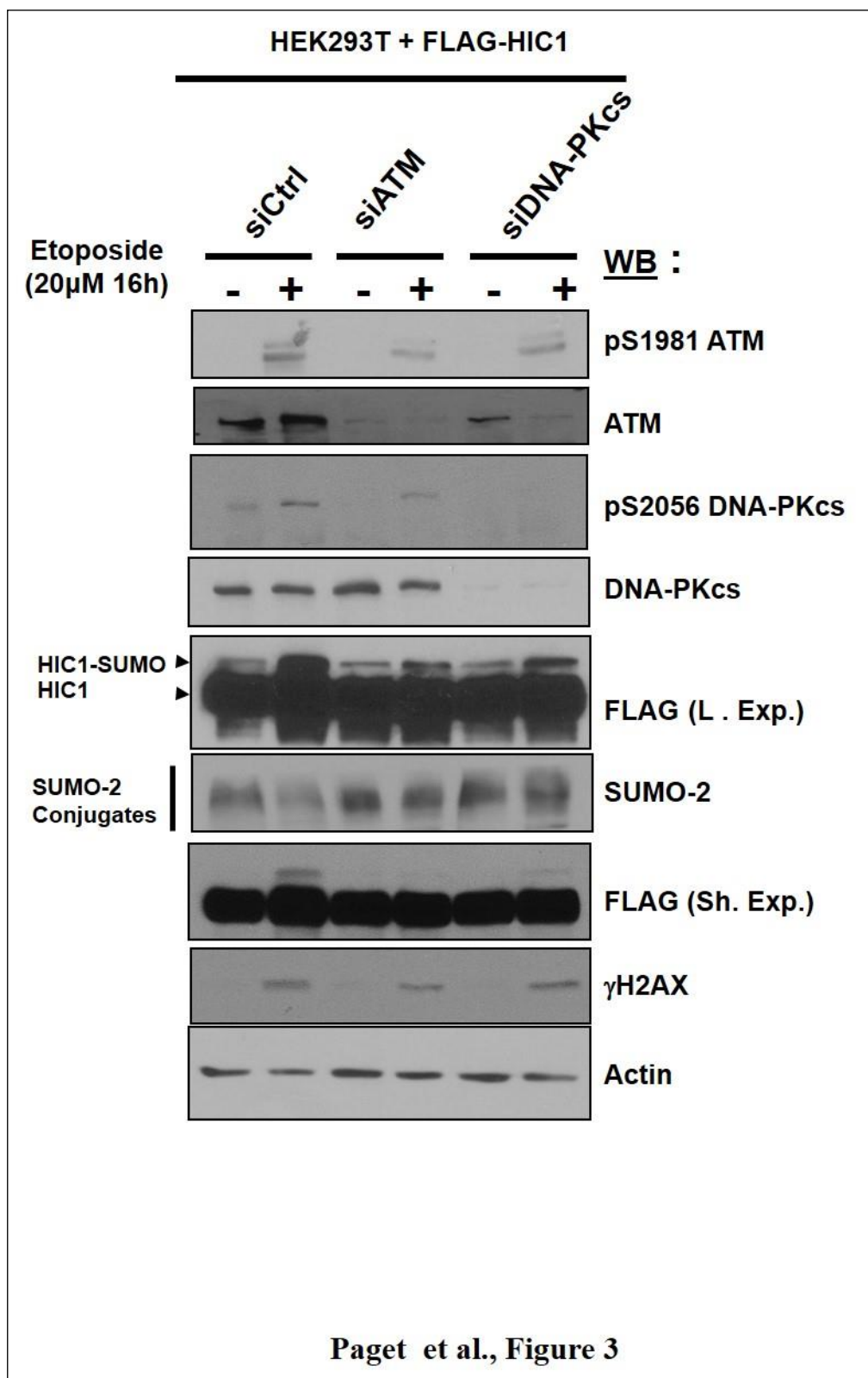
La figure 1A a été refaite entièrement afin d'ajouter le maximum de contrôles. En particulier, nous avons détecté les formes phosphorylées des protéines ATM et H2AX ( $\gamma$ H2AX) et les formes totales de ces protéines afin de s'assurer de l'efficacité du traitement Etoposide de 16h. Nous avons également vérifié l'expression de la protéine SUMO 2 en détectant le Tag anti His. La figure 1B initiale a été déplacée en supplementary Figure 1A puisqu'elle est incluse partiellement dans la figure 1C. A la place, nous avons effectué une expérience de transfection transitoire en surexprimant la protéine HIC1 WT et nous avons effectué les deux types de traitement Etoposide afin de pouvoir comparer sur la même figure les différents niveaux d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 en conditions de dommages à l'ADN réparables (Etoposide 1H) et non réparables (Etoposide 16H). Ainsi, nous mettons en évidence que le niveau de SUMOylation de la protéine HIC1 est augmentée seulement dans des conditions de DSBs non réparables comme nous le montre la quantification du niveau d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 réalisée avec le logiciel MultiGauge. Au niveau de la figure 1C, nous avons re-analysé les échantillons protéiques par Western blot afin d'avoir une meilleure exposition du niveau de l'expression  $\gamma$ H2AX et nous avons également vérifié l'expression de H2AX totale puisqu'un des revieweurs s'inquiétait de la possible non-détection des histones dans nos conditions d'extraction (Lyse directe dans du Laemmli afin de visualiser les protéines SUMOylées). De plus, en supplementary Figure 1B, le niveau d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 entre les différentes conditions de cette figure a été quantifié par le logiciel MultiGauge. Cette quantification montre que le niveau d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 ne change pas significativement entre les différentes conditions. Pour finir, nous n'avons pas apporté de modification au niveau de la Figure 1D.

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

Paget et al., Figure 2

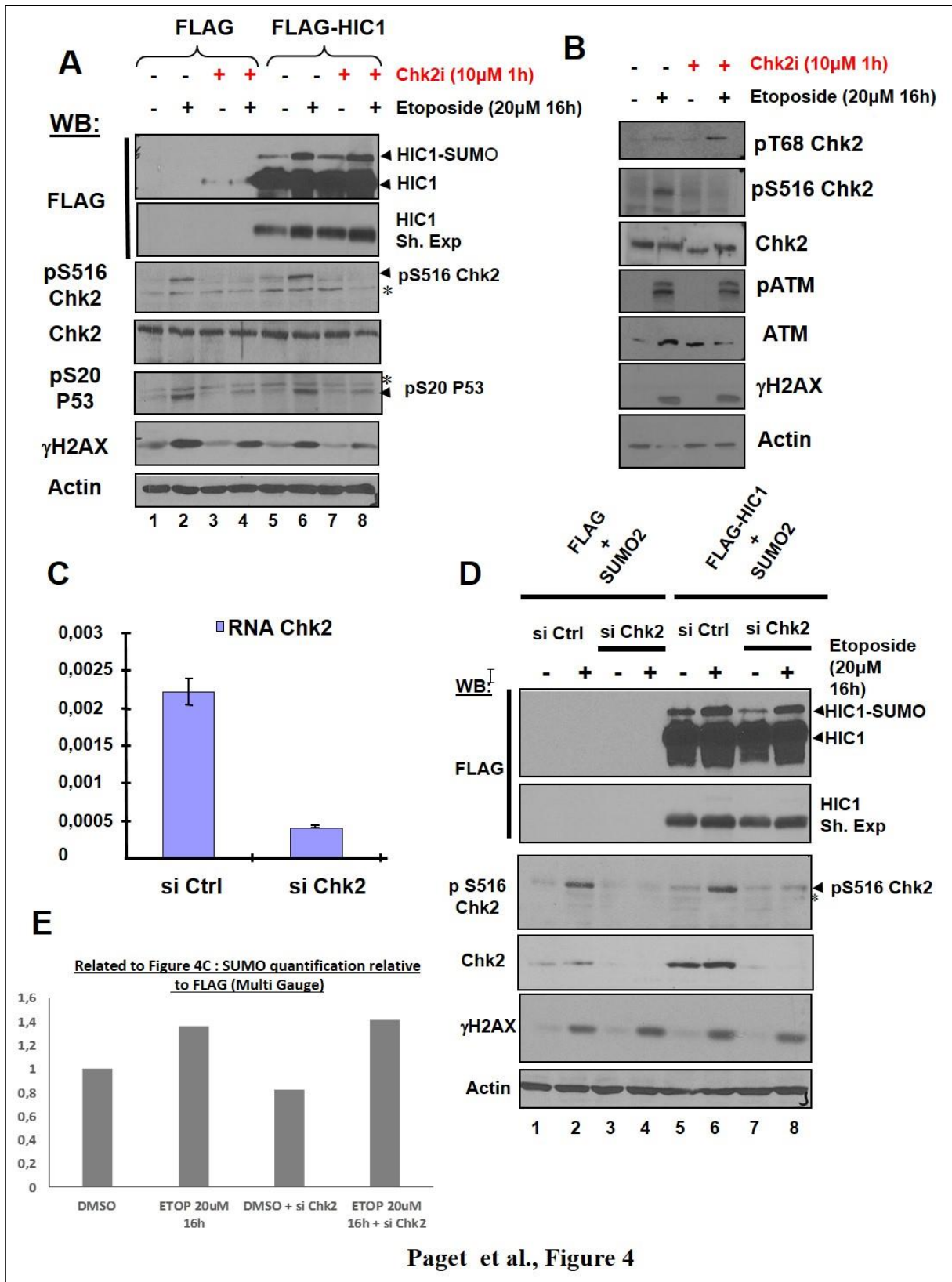
## **Figure 2 :**

Nous avons réalisé des expériences d'essais comètes dans les cellules COS 7 en surexprimant soit la protéine HIC1 WT soit un vecteur vide afin de démontrer que la protéine HIC1 est bien impliquée dans la réparation des DSBs (Figure 2A). Nous avons ensuite effectué un traitement Etoposide de 1h afin d'induire des DSBs réparables et laissé les cellules réparer pendant différents temps 2, 4, 6, ou 24h. Dans un premier temps, nos résultats montrent que 15 à 20% des cellules surexprimant soit la protéine HIC1 ou soit un vecteur vide, possèdent un niveau basal de dommages à l'ADN. Ensuite, nos résultats montrent que la surexpression de la protéine HIC1 WT favorise la réparation des DSBs puisque les cellules surexprimant la protéine HIC1 réparent plus rapidement et/ou plus efficacement les DSBs induit par rapport aux cellules ayant été transfectées avec le vecteur vide. De plus, nous pouvons remarquer une différence significative après 4h de Recovery. En effet, 75 % des cellules surexprimant la protéine HIC1 WT ont réparé les DSBs induits contre 50% des cellules n'exprimant pas la protéine HIC1. Cependant, après 24h de Recovery, toutes les cellules ont réparé les DSBs induits et on retrouve un niveau de DSBs équivalent au niveau basal. Afin de pouvoir faire des tests de significativité, cette expérience devrait être répétée. Cependant, ce résultat est complètement cohérent avec le retard de réparation observé dans les premières étapes du processus de réparation dans les cellules BJ-hTert dans lesquelles l'expression endogène de *HIC1* a été inactivée par ARN interférence (Dehennaut et al., 2013). Les panneaux B, C et D comparant les cellules transfectées par HIC1 WT ou par le mutant non SUMOylable HIC1E316A n'ont pas été modifiés.



### **Figure 3 :**

Cette expérience est en train d'être reproduite afin d'essayer de résoudre le problème observé entre les différents niveaux d'expression des formes phosphorylées et totales de la protéine ATM. Nous testons actuellement les siRNA DNA-PKcs individuellement. En effet, l'effet observé avec le pool des 4 siRNAs DNA-PKcs, c'est-à-dire la diminution des niveaux d'expression d'ATM tant au niveau ARN (qRT-PCR) que protéiques (WB) pourrait s'expliquer par un effet « off target » d'un siRNA DNA-PKcs sur ATM du à une certaine homologie entre les deux séquences. Par exemple, le mi-RNA 101 est capable d'inhiber à la fois DNA-PKcs et ATM en se fixant sur une région très homologue dans leur 3'UTR (Yan et al., 2010). Nous reproduisons donc l'expérience décrite dans la Figure 3 avec un ou deux siRNAs dirigés contre DNA-PKcs qui inhiberait l'expression de DNA-PKcs sans affecter celle d'ATM. Nous effectuerons également des quantifications du niveau d'expression de la SUMOylation de la protéine HIC1 afin de faciliter la compréhension du message de cette expérience.



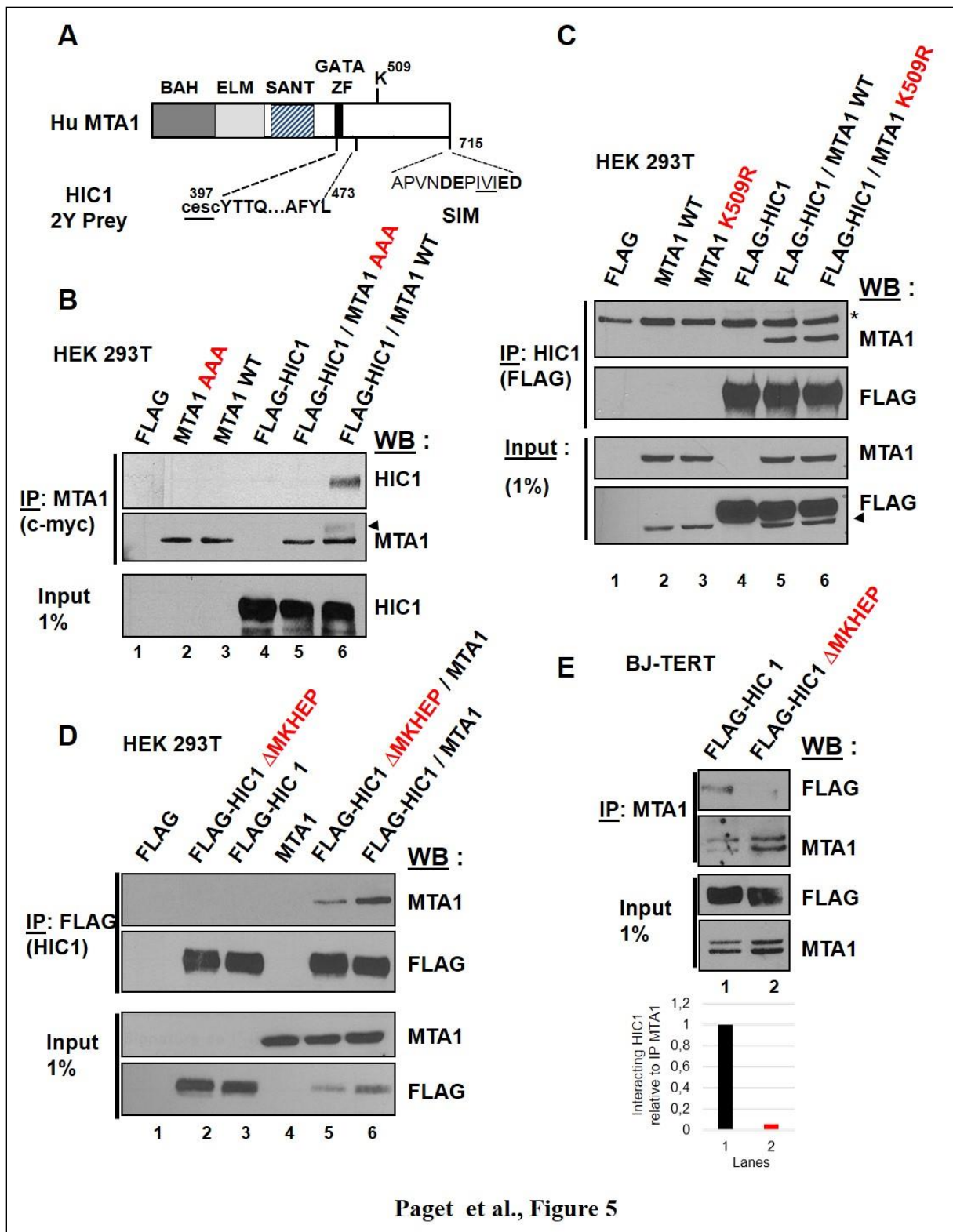
Paget et al., Figure 4



#### Figure 4 :

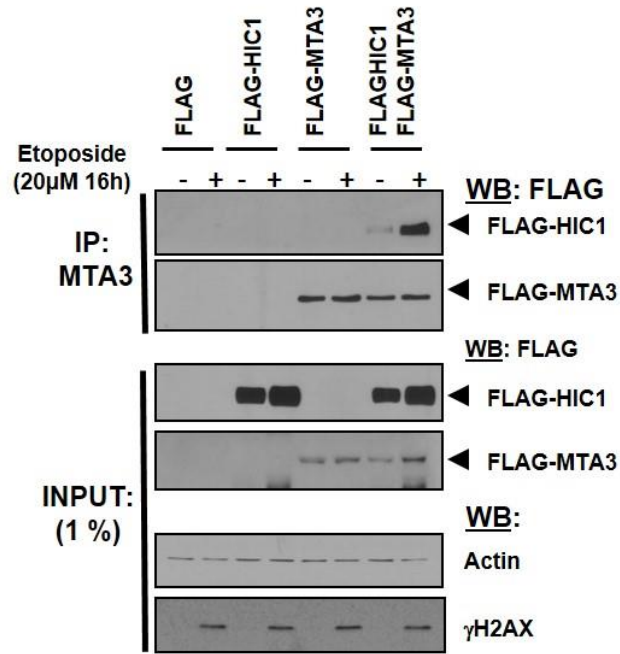
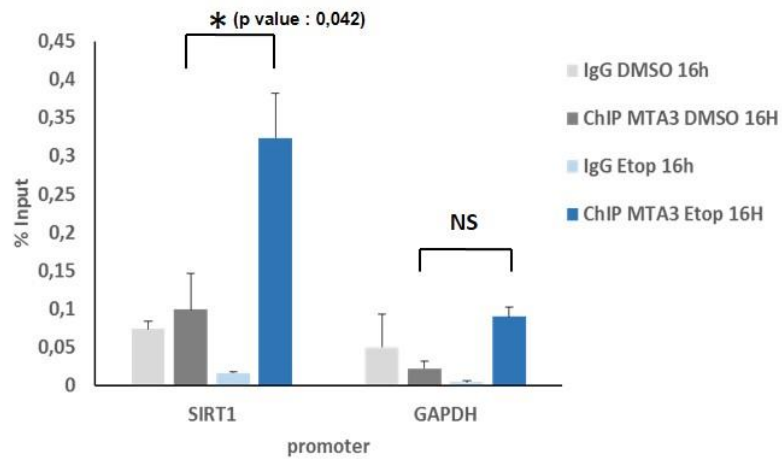
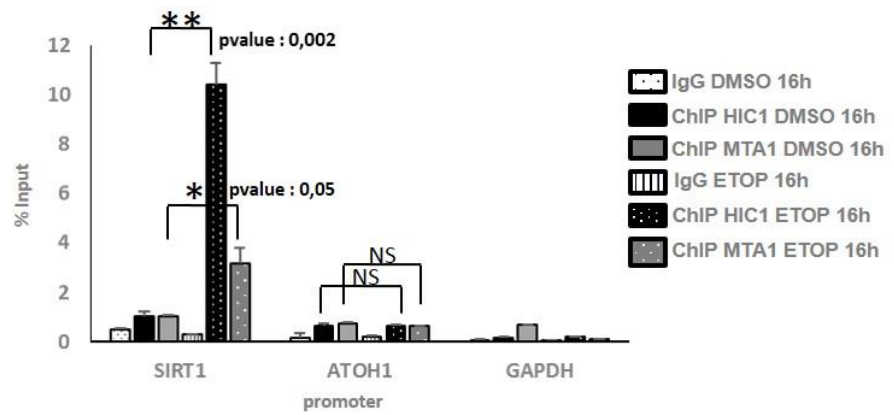
Au niveau de la Figure 4A, nous avons quantifié la SUMOylation de la protéine HIC1 via le logiciel MultiGauge (Supplementary Figure 3). De plus, afin de vérifier que l'inhibiteur de la kinase Chk2 n'impactait pas sur l'activité du domaine kinase de la protéine ATM, nous avons inhibé la kinase Chk2 dans des HEK 293T en présence ou non de DSBs non réparables. Ainsi, par des expériences de Western blot, nous avons montré que cet inhibiteur était spécifique de la kinase Chk2 puisque l'on détecte toujours l'expression de la forme phosphorylée par ATM de la kinase Chk2 au niveau de la Thréonine 68 en réponse aux dommages à l'ADN en présence de DSBs (Figure 1B). L'efficacité du traitement de l'inhibiteur de la kinase Chk2 est vérifiée par la perte d'expression de la forme phosphorylée de la kinase Chk2 au niveau de la Sérine 516.

En ce qui concerne la Figure 1D, nous avons quantifié le niveau de la SUMOylation de la protéine HIC1 dans les différentes conditions grâce au logiciel MultiGauge (Figure 1E). Cette quantification indique que l'augmentation de la SUMOylation observée en réponse aux dommages à l'ADN non réparables, n'est pas dépendante de la kinase Chk2 puisque nous ne remarquons pas de différences significatives du niveau de la SUMOylation de HIC1 en présence ou non du siChk2. Cependant, cette expérience est en train d'être reproduite en absence d'expression ectopique de SUMO 2 comme l'a demandé un des revieweurs.



**Figure 5** :

Cette Figure n'a pas été modifiée puisqu'elle n'avait suscité aucune remarque des reviewers.

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

Paget et al., Revised Figure 6

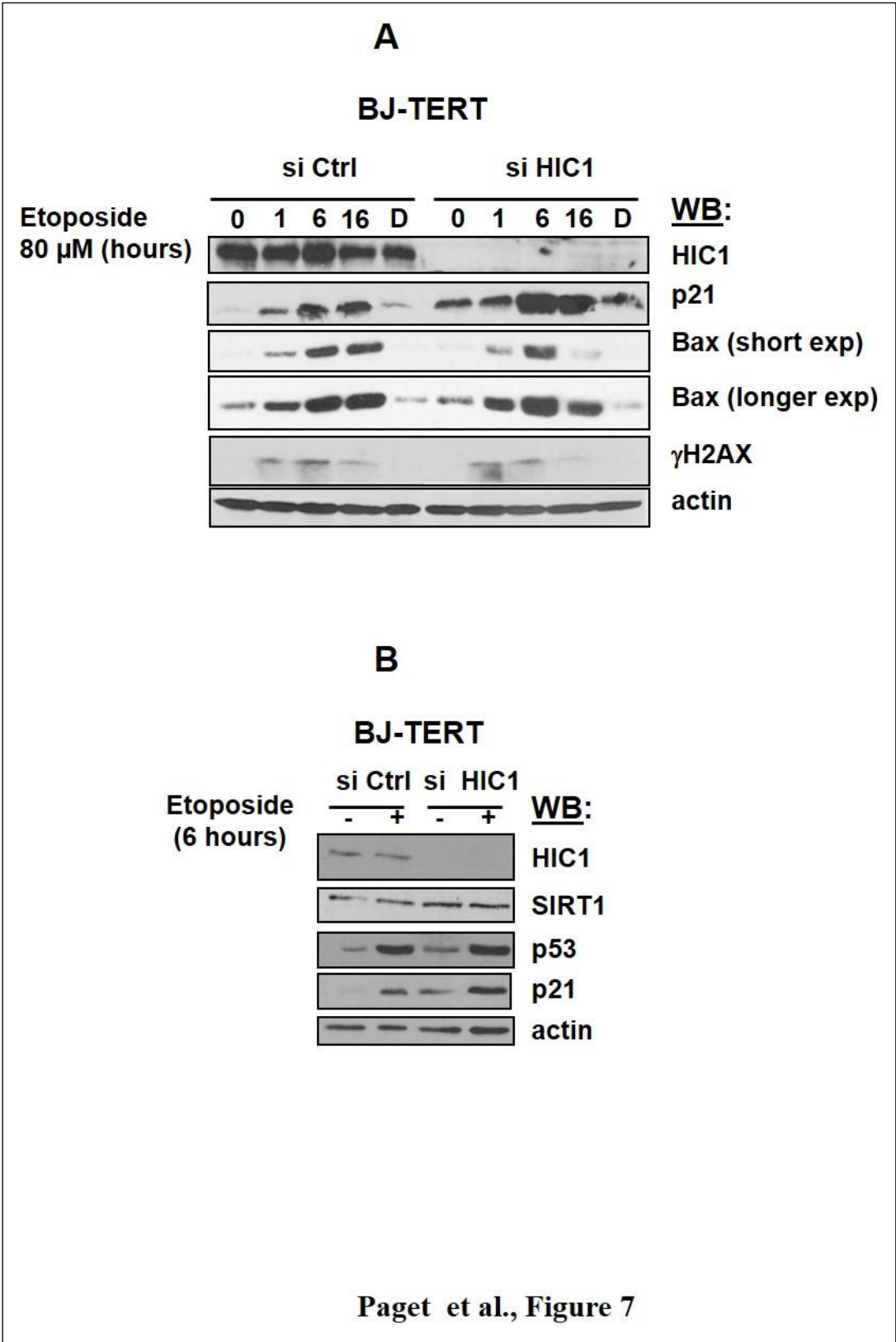
## **Figure 6 :**

La Figure 6 (Interaction entre HIC1 et MTA1, en présence de l'inhibiteur Bix-01294) a été supprimée car celle-ci complexifiait le message de l'article. Elle a été remplacée par une figure décrivant des expériences de ChIP.

Un des points majeurs soulevé par deux reviewers sur 4, était le fait que nous n'avions pas regardé la fixation des protéines HIC1 et MTA1 au niveau du promoteur de *SIRT1* en présence de DSBs non réparables et que nous n'avions analysé que MTA3. De ce fait, nous avons réalisé une expérience de ChIP qPCR sur de la chromatine de BJ-hTert traitées à l'Etoposide pendant 16h. Ainsi, à partir de la chromatine soniquée, nous avons immunoprécipité les protéines HIC1 et MTA1 puis suite à l'analyse de qPCR, nous avons montré que la fixation de MTA1 était augmentée significativement au niveau du promoteur de *SIRT1* en présence de DSBs non réparables (Figure 6C). De manière un peu inattendue, nous avons également montré que la protéine HIC1 se fixait beaucoup plus efficacement. Ce résultat suggère que la SUMOylation de HIC1 mais peut être également d'autres MPTs de HIC1 favorisent sa liaison à l'ADN. Ceci sera analysé dans la partie « Discussion » de ma Thèse comme il le sera dans la discussion de l'article. De plus, nous avons également regardé la fixation des protéines HIC1 et MTA1 au niveau du promoteur de *ATOH1*. Ce gène fut choisi comme contrôle négatif puisqu'il n'est ni exprimé dans les cellules fibroblastiques BJ-hTert ni impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, ce gène code un facteur de transcription pro-neuronal indispensable au développement du cerveau.

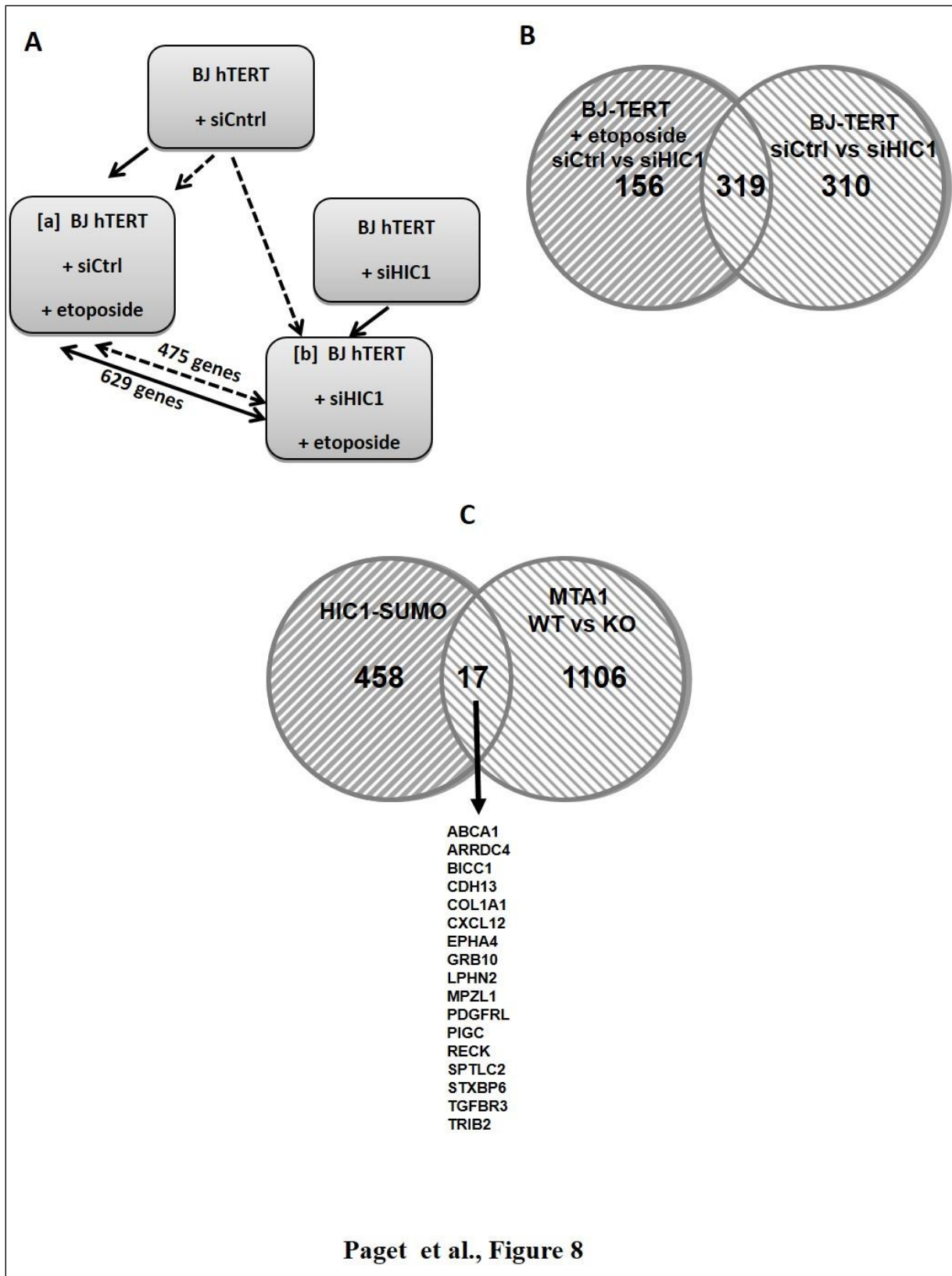
Actuellement, nous sommes en train de réaliser des expériences de ChIP qPCR dans des conditions de dommages à l'ADN **réparables** afin de déterminer si la protéine HIC1 se comporte de la même façon ou non au niveau de ces différents promoteurs et d'analyser également la fixation de MTA1.

Pour finir, les « *pvalue* » qui montrent que nos résultats sont statistiquement significatifs ont été ajoutées à la demande de l'un des reviewers.



**Figure 7 :**

Cette Figure n'a pas été modifiée.

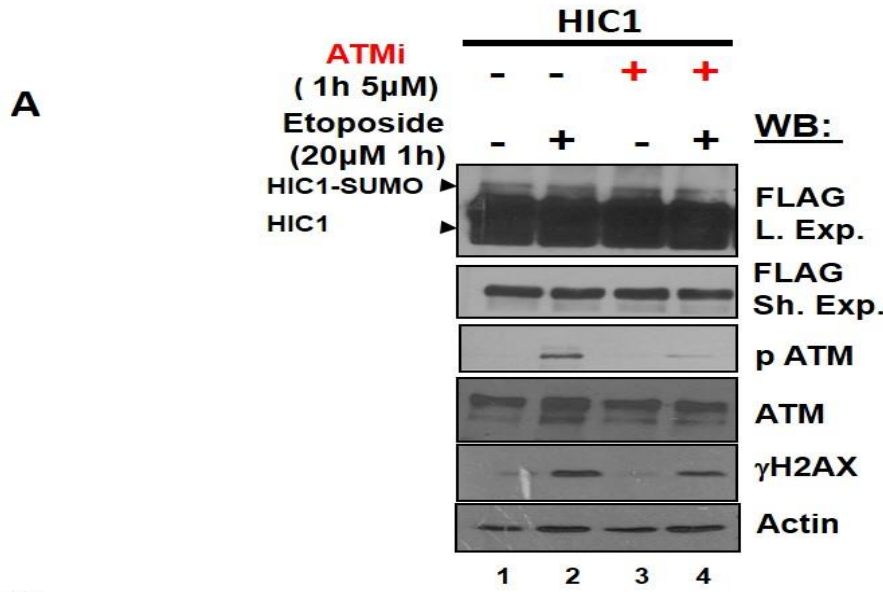




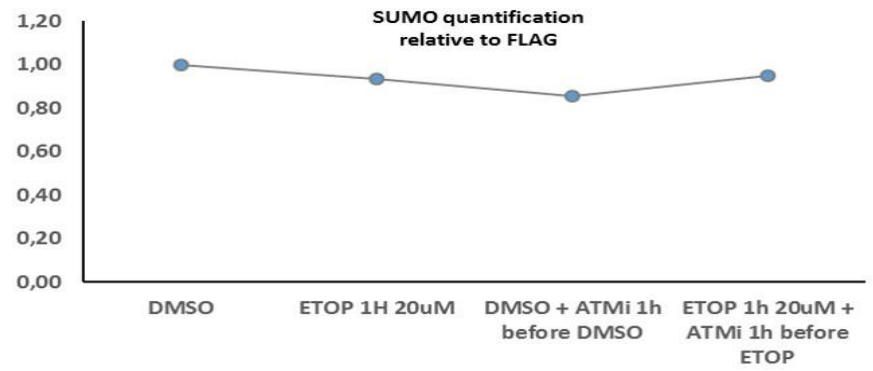
### **Figure 8 :**

Au niveau de cette figure, nous avons ajouté une liste de gènes spécifiquement réprimés par la protéine MTA1. Ceci a été possible grâce à une étude de 2012 qui a identifié de nombreux gènes régulés spécifiquement par la protéine MTA1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (Ghanta et al., 2011). Cette étude a été réalisée en comparant des MEFs possédant la protéine MTA1 WT ou invalidée (MEFs MTA1/KO). De plus, la seule fonction connue de la SUMOylation de HIC1 est d'augmenter l'interaction entre HIC1 et MTA1. Nous avons donc croisé cette liste de gènes cibles de MTA1 avec la liste des 475 gènes spécifiquement réprimés par la protéine HIC1 « SUMOylée » (BJ-hTERT+siCtrl+Etop/ BJ-hTERT+siHIC1+Etop) afin de sélectionner les gènes potentiellement co-régulés par les protéines HIC1 et MTA1 en réponse aux DSBs non réparables. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec le Dr Brian Rood, et a permis d'établir une autre liste de 17 gènes communs potentiellement co-régulés par les protéines HIC1 et MTA1.

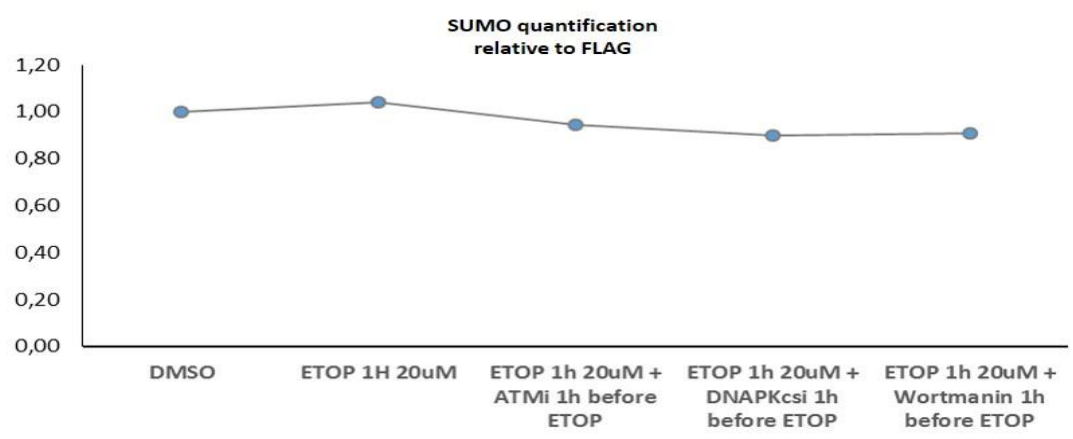
Nous sommes actuellement en train de valider certains de ces gènes cibles potentiellement co-régulés par des expériences de qRT-PCR pour répondre aux critiques des reviewers.



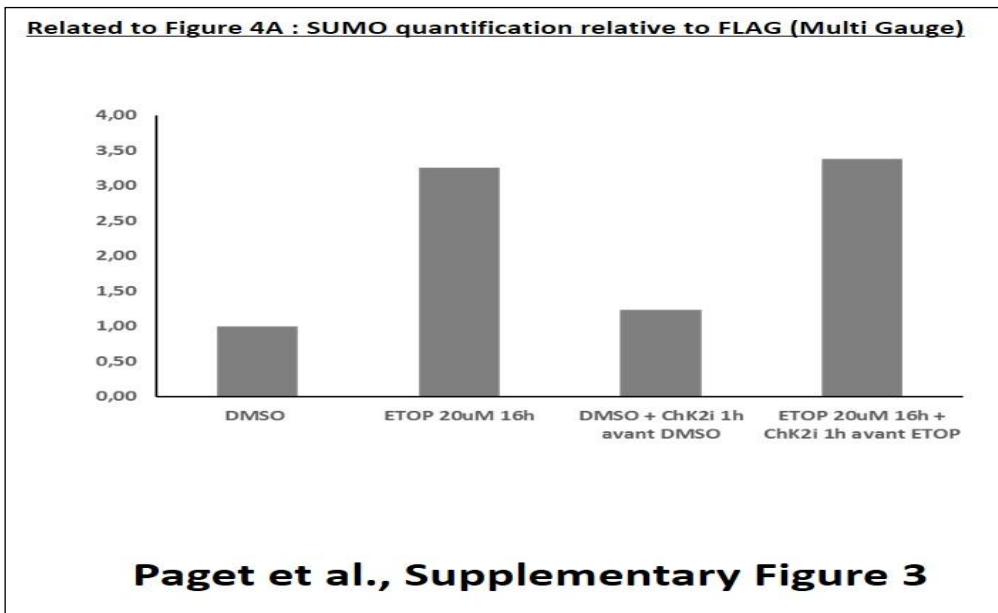
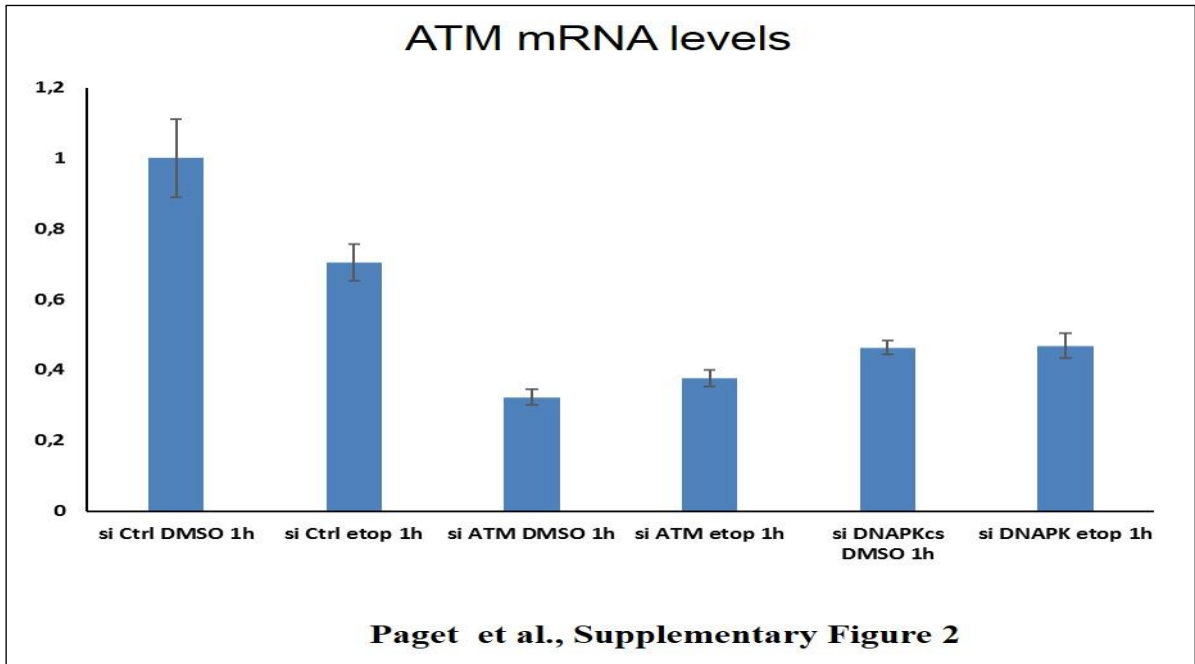
**B** Related to Figure 1B : SUMO quantification relative to FLAG (Multi Gauge)



**C** Related to Figure 1C : SUMO quantification relative to FLAG (Multi Gauge)



**Paget et al., Supplementary Figure 1**





## Publication n°2

### Le suppresseur de tumeur HIC1 est une nouvelle cible directe de la kinase ATM en réponse aux cassures double brin de l'ADN

(Publication en cours de préparation)

Sonia Paget et al.,

Les résultats décrits dans de la première partie de ma thèse ont démontré que la SUMOylation de HIC1 n'est pas requise pour la réparation des cassures double brin (DSBs) induites en réponse aux dommages à l'ADN non réparables (Paget et al., 2016 ; Oncotarget, en révision). De plus, HIC1 est un nouvel acteur essentiel pour le bon déroulement de la DDR dans le cas de dommages réparables (Dehennaut et al., 2013). En effet, des fibroblastes normaux traités à l'Etoposide pendant 1 heure puis incubés en milieu normal réparent moins efficacement et/ou moins rapidement les dommages à l'ADN s'ils ont été au préalable transfectés par des ARNs interférant (siRNAs) ciblant HIC1 que des fibroblastes traités mais transfectés avec un siRNA contrôle comme l'ont montré la persistance des foyers  $\gamma$ H2Ax et des essais comètes (Dehennaut et al., 2013). Pour rappel, la technique d'essais comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose qui permet de détecter et quantifier les cassures de l'ADN mais aussi de mesurer l'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN si les cellules sont cultivées en milieu normal suite à l'induction des dommages. Le taux d'ADN endommagé est alors proportionnel à la taille des queues des comètes observées dans les noyaux des cellules au cours de l'électrophorèse.

En présence de DSBs, l'évènement clé de la DDR est l'activation des kinases de la famille PIKK (ATM/ATR/DNAPKcs). Ces kinases phosphorylent leurs substrats au niveau d'un site consensus conservé et facile à détecter dans une séquence peptidique, S/T QG. Ce site est composé d'une Sérine ou d'un Thréonine suivie d'une Glutamine et d'une Glycine. Grâce à une étude *in silico*, l'équipe a identifié dans la séquence peptidique de HIC1 un unique site potentiel de phosphorylation pour ces kinases dans l'extrémité C-terminale : **LS<sup>694</sup>QG**.

Pour confirmer la fonctionnalité de ce site, une étude de protéomique réalisée en collaboration avec le Dr Adeline Page (IGBMC, Strasbourg) a été réalisée et a identifié des MPTs spécifiquement observées en réponse aux DSBs réparables induits par un

traitement d'une heure avec de l'Etoposide dans les HEK 293T transfectées par un vecteur d'expression FLAG-HIC1. Deux sites potentiels de phosphorylation (Table 6) dont la Sérine 694 en C-terminal de HIC1 et un site d'acétylation sur la Lysine 623 qui est située au niveau d'un site consensus potentiel de Tip60, une acétyl-transférase impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN ont ainsi été identifiés.

Peptides	Modification Sites	Non traité	Etoposide 1H 20µM
216-RcsPLcGLDLSK-227	Sp218	X	X
244-ELPPRPDsPPsAGPAAYK-261	Sp251/Sp254	X	X
278-LEEAAPPsDPFR-289	Sp285		X
315-HEPGLGsYGDELGR-328	Sp321	X	X
341-GGDAAVsPGGPPLGLAPPPR-360	Sp347	X	X
361-YPGsLDGPGAGGDGDDYK-378	Sp364	X	X
565-IHsGEKPYECQVCGGK-580	Sp567	X	X
622-GkLDFPEGVFAVAR-635	<b>K<sub>ac</sub>623</b>		X
678-FTAELGLsPDK-688	Sp685	X	X
689-AAEVLsQGAHLAAGPDGR-706	<b>Sp694</b>		X
707-TIDRFsPT-714	Sp712	X	X

**Table 6 : Différentes MPTs de HIC1 induites spécifiquement en réponse aux DSBs (Collaboration avec le Dr Adeline Page, IGBMC, Strasbourg)**

Afin de déterminer l'importance de ces sites, une étude de Phylogénie a été effectuée (Table 7). La comparaison des différentes séquences peptidiques entre les mammifères et les oiseaux a montré que la Sérine 285 n'était pas conservée (données non montrées) entre ces différentes espèces contrairement à la Sérine 694 qui est bien conservée chez les mammifères, chez les oiseaux et chez les reptiles. Cependant, chez les oiseaux, les reptiles et les amphibiens, nous remarquons un petit décalage d'une dizaine d'acide aminés au niveau de ce site. Enfin, cette analyse a montré que la Lysine 623 est un acide aminé extrêmement conservé depuis les mammifères jusqu'aux reptiles. Ainsi, nous avons choisi d'étudier uniquement les MPTs de la Sérine 694 et de la Lysine 623 en réponse aux DSBs.

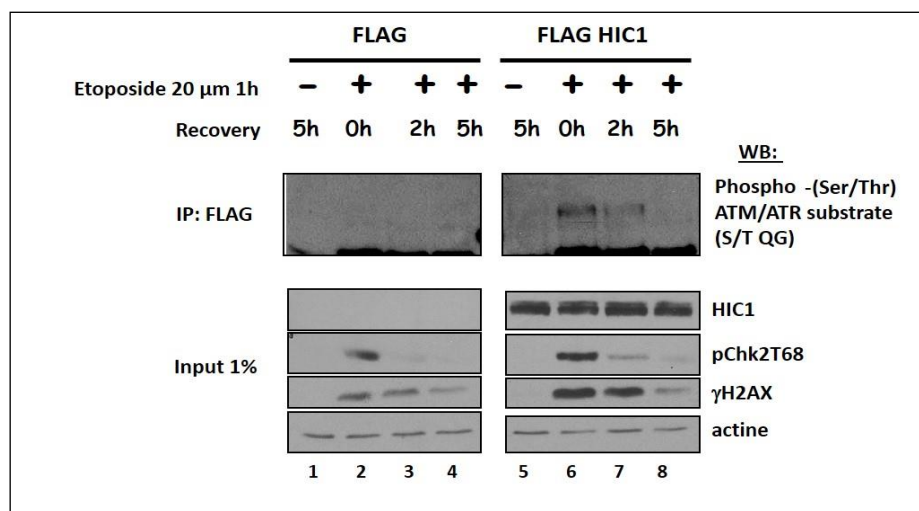
		<b>623</b>
<b>Human</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Rat</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Mus</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Hamster</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVAGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Cow</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Dog</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGGAAGAAGALAGLGGLPGVPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLSLKQQ	
<b>Opossum</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AVGAGGGAAGALAGLGGLPGAPGPDGK <sup>K</sup> LDLFPEGVFAVARLTAEQLGLKQQ	
<b>Chicken</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AA-----GPDGK <sup>K</sup> LDLPDSVYAMARLTADQLGLKQE	
<b>Turtle</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> AA-----GPEGK <sup>K</sup> LDLPESVYAMARLTADQLGLKQE	
<b>Xenopus</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> TT-----GPDGK <sup>K</sup> LDLPESVYAMAKFTADHLGMKQE	
<b>Coelacanth</b>	LISHM <sup>H</sup> M <sup>M</sup> K <sup>M</sup> H <sup>H</sup> TS-----VPDCKP <sup>K</sup> LEFPESVYSMAKFTADHLGLKQE	
<b>Consensus</b>	*****:	*: * <b>**</b> :* :.*::*::**:*:*::**:
		<b>694</b>
<b>Human</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Rat</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Mus</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Hamster</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Cow</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Dog</b>	DKAA-AAELLAQTTHFLHDPKVALES <sup>S</sup> LYPLAKFTA-ELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QGAHLAAGPD	
<b>Opossum</b>	DKAAAAELLAQTTHFLHDPKAALES <sup>S</sup> LYPLAKFTAELGLSPDKAAEVL <sup>S</sup> QSAHLAAGPD	
<b>Chicken</b>	K----AAELLSHTSHFLSDPK-AMESLYPLAKFTA <sup>E</sup> HLGL <sup>S</sup> QDKAAEVLAQAPHLHAD-A	
<b>Turtle</b>	K----AAELLSHTSHFLSEPK-GMDSLYPLARFTA <sup>E</sup> HLGL <sup>S</sup> QEKAAELLGPGPLLHA---	
<b>Xenopus</b>	K----AAEILSQTSHFLNDPK-TLESLYPLAKFTA <sup>E</sup> HLGL <sup>S</sup> QEKAAEVLGPI <sup>S</sup> HLGSD--	
<b>Coelacanth</b>	K----ASDLLNQTSHLISDSK-TMESLYPLAKFTA <sup>E</sup> HLGL <sup>S</sup> HEKATEVLT <sup>S</sup> QTSHLANE--	
<b>Consensus</b>	. *:::* :*:*: : * :*****:*** .**:: :*:*: * *	
<b>Human</b>	GRTIDRFSP	
<b>Rat</b>	SRTIDRFSPA	
<b>Mus</b>	SRTIDRFSP	
<b>Hamster</b>	GRTIDRFSP	
<b>Cow</b>	GRTIDRFSP	
<b>Dog</b>	GRTIDRFSP	
<b>Opossum</b>	GRTIDRFSP	
<b>Chicken</b>	ARTIERYSPP	
<b>Turtle</b>	ERTIERYSPP	
<b>Xenopus</b>	SRIIERFSSP	
<b>Coelacanth</b>	NRTIERFSPN	
<b>Consensus</b>	* *:*:*	

**Table 7 : Comparaison des extrémités C-terminales de HIC1 (programme CLUSTAL)**

## I/ Caractérisation de la phosphorylation de la Sérine 694 de HIC1 par une kinase de la famille PIKK (ATM/DNAPKcs)

### 1/ Validation de la phosphorylation de la protéine HIC1 en réponse aux DSBs

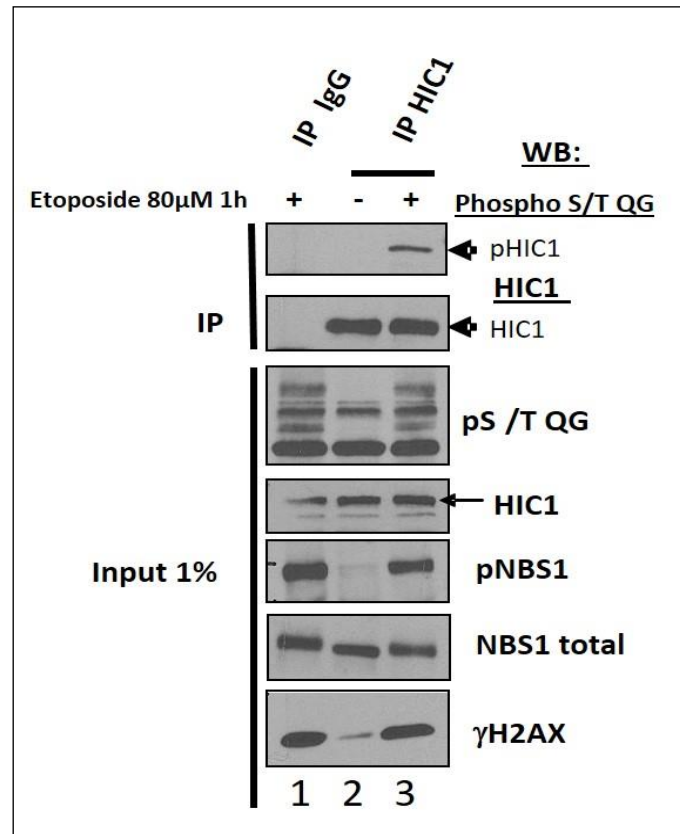
Dans un premier temps, nous avons vérifié que la protéine HIC1 était bien phosphorylée par des kinases de la famille PIKK suite à l'induction de dommages à l'ADN. Pour cela, nous avons surexprimé la protéine HIC1 WT par transfection transitoire dans les HEK293T, induit des dommages à l'ADN par l'utilisation d'une drogue pharmacologique l'Etoposide pendant 1h puis laissé les cellules réparer les dommages pendant différents temps (2h ou 5h). Après avoir immunoprécipité la protéine HIC1, nous montrons que celle-ci est phosphorylée en réponse aux DSBs (Figure 36, piste 6) à l'aide d'un anticorps commercial dirigé contre les substrats d'ATM et d'ATR phosphorylés sur une Sérine ou une Thréonine (pS/T QG) (Cell Signaling) et que cette phosphorylation diminue progressivement (Figure 36, pistes 6 à 8) jusqu'à sa disparition totale après 5h de culture dans du milieu normal (« Recovery »). Cette diminution de phosphorylation suit la même cinétique que la phosphorylation de la protéine Chk2 et de la protéine  $\gamma$ H2AX, deux cibles d'ATM, traduisant ainsi l'activation des voies de signalisation de la réparation des dommages perçus.



**Figure 36 :** Détection de la phosphorylation de la protéine HIC1 au cours de la réparation des dommages à l'ADN dans les cellules HEK 293T

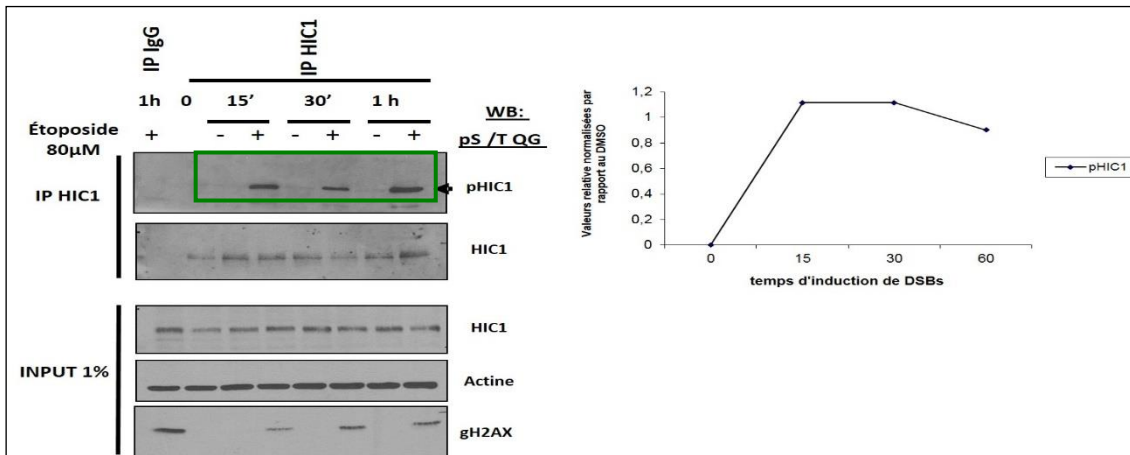


Nous avons également confirmé la phosphorylation de la protéine endogène HIC1 suite à l'induction de DSBs réparables (Figure 37, piste 3). Pour cela, nous avons induit des dommages à l'ADN puis, effectué des expériences d'enrichissement nucléaire et d'immunoprécipitation dans des fibroblastes humains BJ-hTert qui expriment HIC1 et effectué des analyses en Western blot. Dans cette expérience, nous avons choisi d'utiliser la protéine NBS1 comme contrôle d'activation de la protéine kinase ATM.



**Figure 37 : Détection de la phosphorylation de la protéine endogène HIC1 dans des fibroblastes BJ-hTert**

Dans un second temps, nous avons étudié le profil de phosphorylation de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN. Pour cela, nous avons effectué une cinétique d'induction de dommages à l'ADN dans les fibroblastes humains BJ-hTert. Nos analyses par Western blot nous ont permis de détecter la phosphorylation de la protéine HIC1 dès 15 minutes d'induction de DSBs grâce à un anticorps dirigé contre les substrats d'ATM phosphorylés sur une Sérine ou une Thréonine. De plus nous montrons que celle-ci persiste après 1h de traitement Etoposide (Figure 38, encadré vert).



**Figure 38 :** Cinétique de phosphorylation endogène de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules BJ-hTert

## 2/ Validation de la phosphorylation spécifique de la Sérine 694 de HIC1 en réponse aux DSBs

Afin de valider la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1, nous avons obtenu un anticorps spécifiquement dirigé contre la forme phosphorylée de cette Sérine (Covalab), et nous avons créé deux mutants ponctuels :

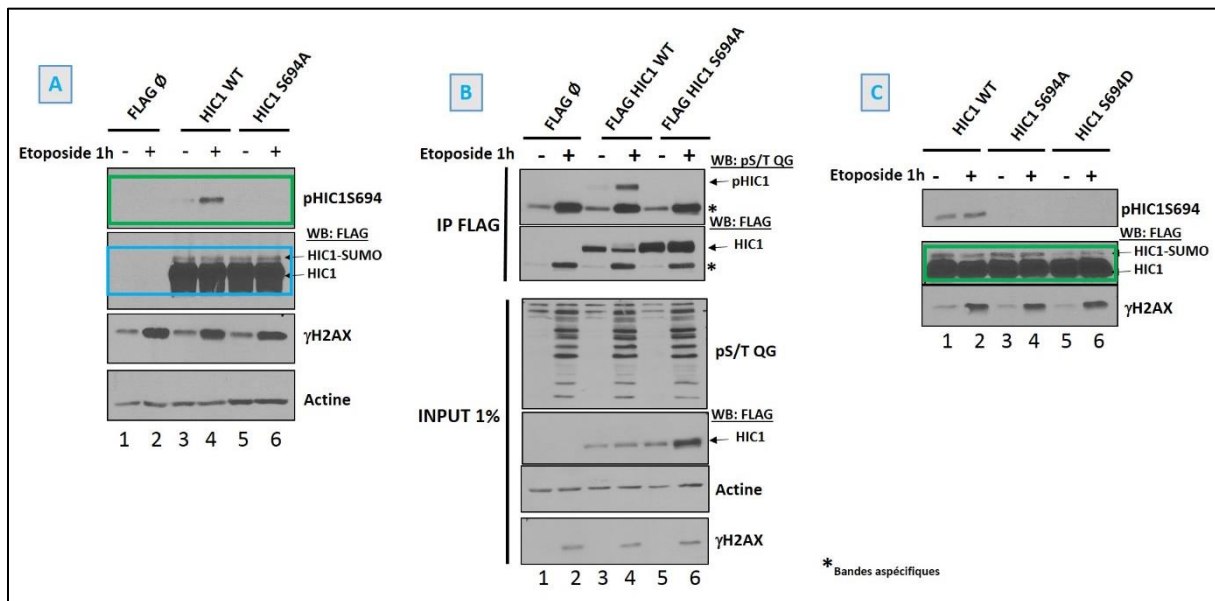
- un mutant ponctuel non phosphorylable, que l'on nommera HIC1S694A, dans lequel nous avons remplacé la Sérine 694 par une Alanine.

- un mutant ponctuel mimant une phosphorylation constitutive, que l'on nommera HIC1S694D, dans lequel nous avons remplacé la Sérine 694 par un acide Aspartique.

Par l'utilisation de ces deux outils, nous avons confirmé par transfection transitoire dans des HEK 293T que la protéine HIC1 est phosphorylée spécifiquement au niveau de la Sérine 694 en réponse aux DSBs réparables (Figure 39A, pistes 4 et 6, encadré vert).

De plus, il fallait s'assurer que la Sérine 694 soit bien l'unique site de phosphorylation de la protéine HIC1 par les kinases de la famille PIKK en réponse aux dommages à l'ADN. Pour cela, après avoir surexprimé les protéines HIC1 WT et HIC1S694A dans des HEK 293T, suivi de l'induction de DSBs, une expérience d'immunoprécipitation a été effectuée afin de pouvoir détecter la phosphorylation de la protéine HIC1 grâce à l'anticorps pS/T QG (Figure 39B). Nos résultats confirment l'unique site de

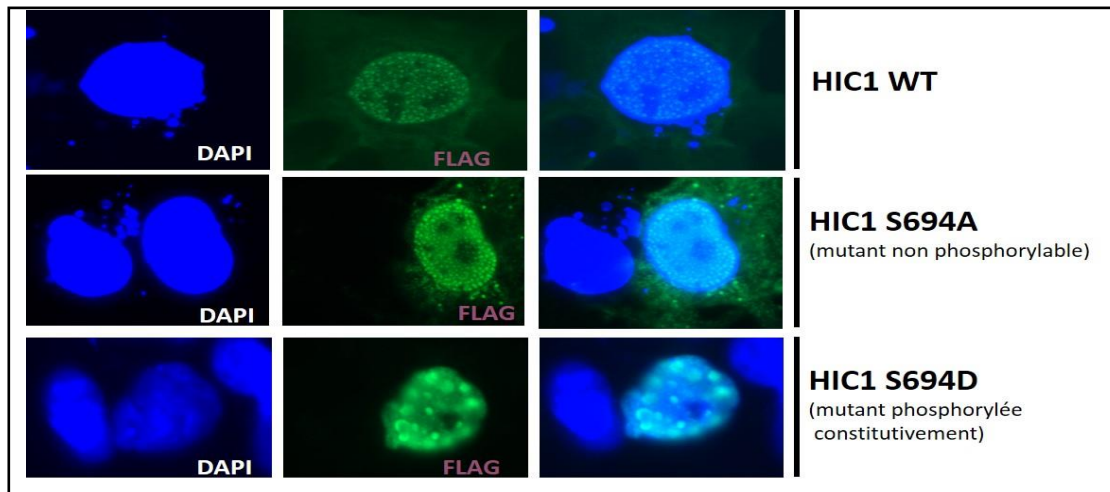
phosphorylation au niveau de la Sérine 694 puisque l'anticorps anti pS/T QG ne détecte pas de forme phosphorylée de la protéine HIC1 après surexpression du mutant HIC1S694A.



**Figure 39 :** La Sérine 694 est phosphorylée en réponse aux DSBs dans les cellules HEK 293T

La Figure 39, nous montre également que la phosphorylation de la Sérine 694 n'impacte pas sur la SUMOylation de la Lysine 314 de la protéine HIC1 puisque le mutant non phosphorylable HIC1S694A se comporte de la même façon que la protéine HIC1 non mutée (Figure 39A, encadré bleu). En effet, lorsque l'on induit des dommages réparables, le niveau « basal » de SUMOylation de la protéine mutée HIC1S694A est similaire à celui de la protéine WT. Par contre, le mutant mimant la phosphorylation constitutive HIC1S694D montre un niveau de SUMOylation identique entre les conditions non traitées et lorsque l'on induit des dommages à l'ADN mais ce niveau est beaucoup plus faible que celui de la protéine HIC1 WT (Figure 39C, encadré vert). A l'heure actuelle, ce résultat n'est pas expliqué.

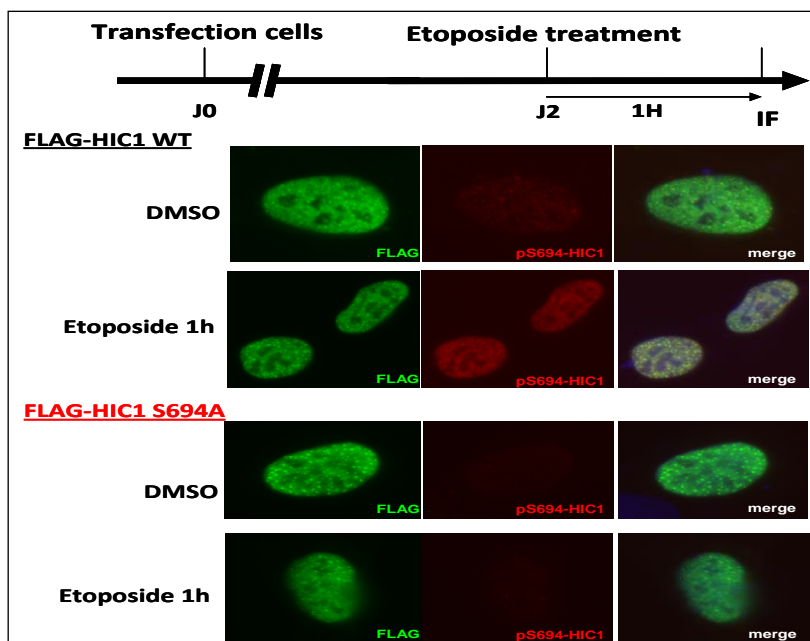
Nous avons également vérifié si ces mutations ponctuelles affectaient la localisation de la protéine HIC1. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de surexpression et d'immunofluorescence dans des cellules HEK293T (Figure 40).



**Figure 40 : Localisation des différents mutants de la protéine HIC1 par Immunofluorescence**

Nos résultats ne montrent aucune altération globale de la localisation des protéines HIC1 mutées HIC1S694A et HIC1S694D. En effet, les deux formes mutées de la protéine HIC1 sont localisées au niveau nucléaire comme la protéine WT. Par contre, nous n'avons pas étudié leur localisation subnucléaire. Ceci a été fait dans le cas de la protéine HIC1 endogène (voir Figures 54 et 55).

Nous avons continué à caractériser la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 lorsque l'on induit des dommages à l'ADN réparables. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence (IF) afin de déterminer si celle-ci avait un impact sur la localisation de la protéine HIC1 en réponse aux DSBs. Dans un premier temps, nous avons donc surexprimé les protéines HIC1 WT et HIC1S694A dans les cellules U2OS (ostéosarcome humain) puis effectué des expériences d'immunofluorescence (Figure 41). Ces résultats nous montrent que la forme phosphorylée de la protéine HIC1 est uniquement nucléaire. Nous ne détectons plus de phosphorylation de la Sérine 694 suite à l'induction de dommages à l'ADN réparables après surexpression de notre protéine mutée HIC1S694A ce qui valide encore une fois la spécificité de notre anticorps (Figure 41).



**Figure 41 :** Localisation de la protéine HIC1 phosphorylée sur la S694 dans des cellules U2OS

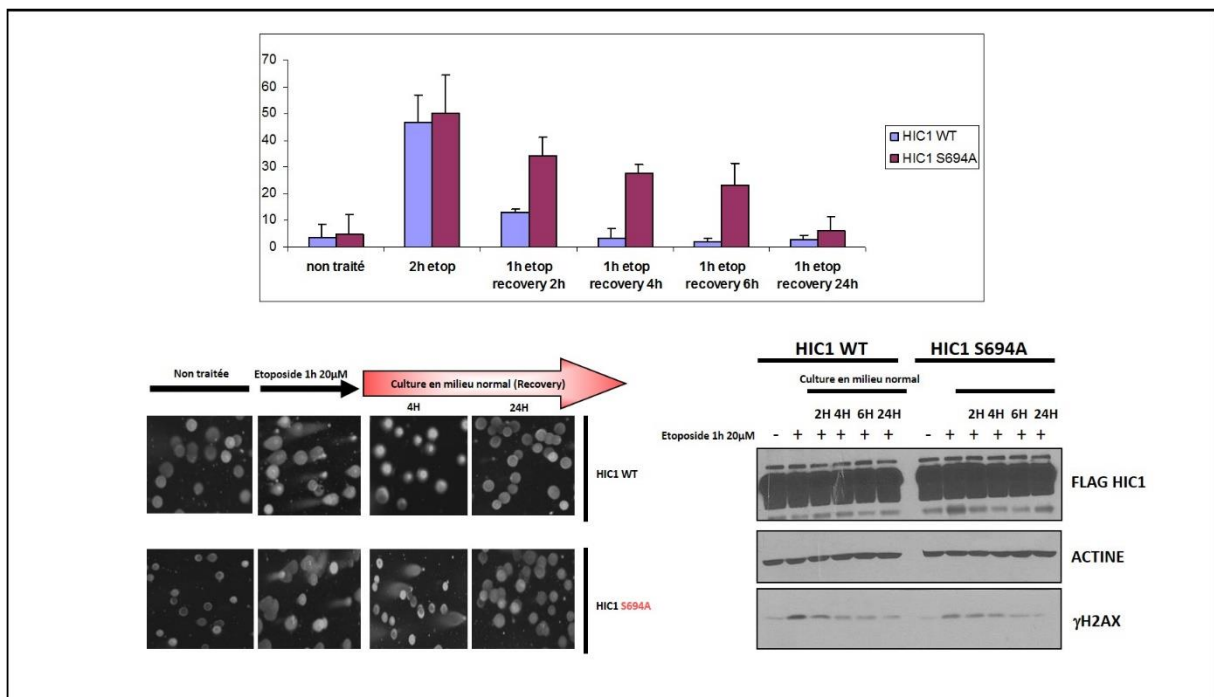
Nous avons donc validé par différentes approches la phosphorylation de la Sérine 694 de HIC1 identifiée sur la base d'un consensus pour les PIKK et retrouvée dans une analyse protéomique de HIC1 surexprimé dans les cellules HEK 293T soumises à des DSBs réparables.

### **II/ Détermination de la fonction de la phosphorylation de la Sérine 694 en réponse aux DSBs**

#### **1 / La phosphorylation de HIC1 sur la Sérine 694 joue un rôle important dans la réparation des DSBs**

Dans une seconde partie, afin de déterminer si la phosphorylation de cette Sérine 694 jouait un rôle dans la réparation des DSBs, nous avons effectué des expériences d'essais comètes. Pour cela, après avoir surexprimé les protéines HIC1 WT ou HIC1 mutée (HIC1S694A) dans des cellules Cos 7 (qui présentent très peu de dommages dans les cellules non traitées par rapport aux HEK 293T) et induit des dommages à l'ADN réparables, nous avons changé le milieu de culture et laissé les cellules réparer les dommages pendant différents temps. Nous avons quantifié les dommages en comptant le nombre de cellules « comètes positives » sur un total de 100 cellules à ces différents temps. Pour toutes nos expériences d'essais comètes,

nous avons utilisé le même protocole. Par cette technique, nous avons pu mettre en évidence que la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 était importante pour la réparation des cassures double brin. En effet comme nous pouvons le voir sur la Figure 42, après 4H de « recovery » en milieu normal, les cellules surexprimant la protéine HIC1 WT ont réparé la totalité des cassures double brin alors que les cellules surexprimant la protéine HIC1 mutée HIC1S694A n'ont réparé que 50% des dommages perçus. Par contre après 24h de « recovery » les cellules surexprimant la protéine HIC1 mutée ont réparé la totalité des cassures induites par le traitement Etoposide. Cela signifie donc que la phosphorylation de la Sérine 694 est importante pour la contribution de HIC1 dans la réparation mais principalement dans les 1ères étapes du processus de réparation des cassures double brin puisque 24h après l'induction de dommages à l'ADN réparables toutes les cassures sont réparées même dans le cas du mutant S694A.

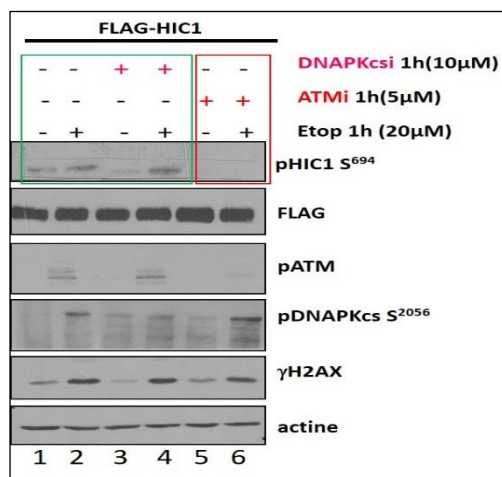


**Figure 42 :** La phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 est importante pour la contribution de HIC1 dans la réparation des cassures double brin

## 2/ HIC1 est une cible directe de la kinase ATM en réponse aux DSBs

Lorsque la cellule détecte des cassures double brin, celle-ci active un réseau de voies de signalisation complexes impliquant les kinases de la famille PIKK (ATM

ou DNAPKcs) permettant la réparation des dommages perçus. Afin de déterminer laquelle de ces kinases est impliquée dans la phosphorylation de la protéine HIC1 endogène, nous avons choisi de les inhiber par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de chacune d'elles. Puis, nous avons induit des dommages à l'ADN avant d'effectuer des expériences de transfection transitoire de HIC1 dans des HEK 293T. Nos résultats montrent que l'inhibition pharmacologique de la sous unité catalytique de la kinase DNAPKcs n'influence pas le niveau de phosphorylation de la Sérine 694 de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables en comparaison avec les cellules seulement traitées avec 20µM d'Etoposide pendant 1h (Figure 43, pistes 1 à 4, cadre vert). Par contre, l'inhibition de la kinase ATM avec 10µM d'inhibiteur spécifique diminue fortement le niveau de phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 par rapport aux cellules traitées seulement avec l'Etoposide (Figure 43, pistes 5 et 6, cadre rouge).

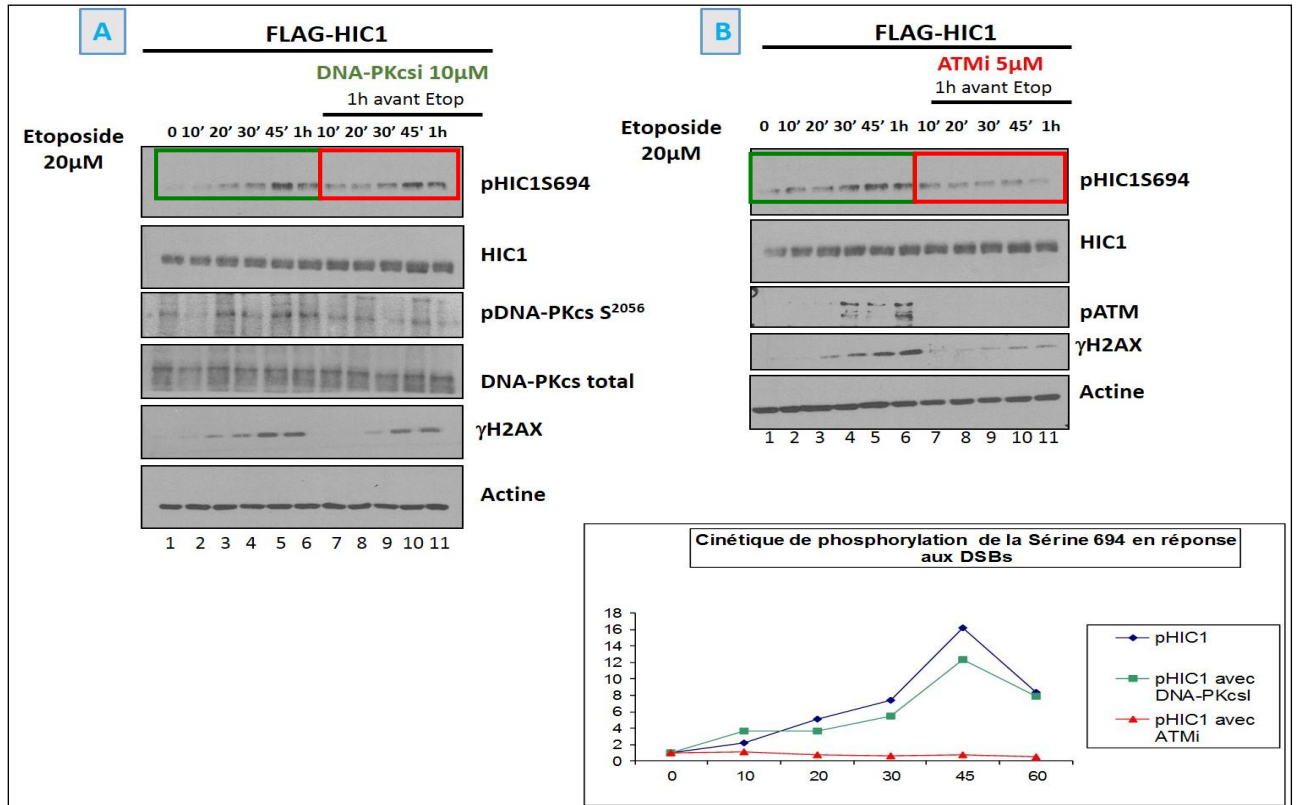


**Figure 43 : La phosphorylation de la Sérine 694 est strictement dépendante de la kinase ATM**

De plus, nous avons étudié la cinétique de phosphorylation de la Sérine 694 dans les mêmes cellules HEK 293T (Figure 44). Après avoir surexprimé la protéine HIC1, nous avons induit des DSBs dans des cellules prétraitées ou non avec les inhibiteurs spécifiques de la kinase ATM ou DNAPKcs puis, nous avons détecté par WB la forme phosphorylée au niveau de la Sérine 694 de la protéine HIC1. Nous avons pu montrer que la protéine HIC1 est phosphorylée en réponse aux DSBs et présente un pic de phosphorylation après 45 minutes d'induction de dommages à l'ADN (Figures 44A et 44B, pistes 1 à 5, encadré vert). De plus nous confirmons l'implication de la kinase



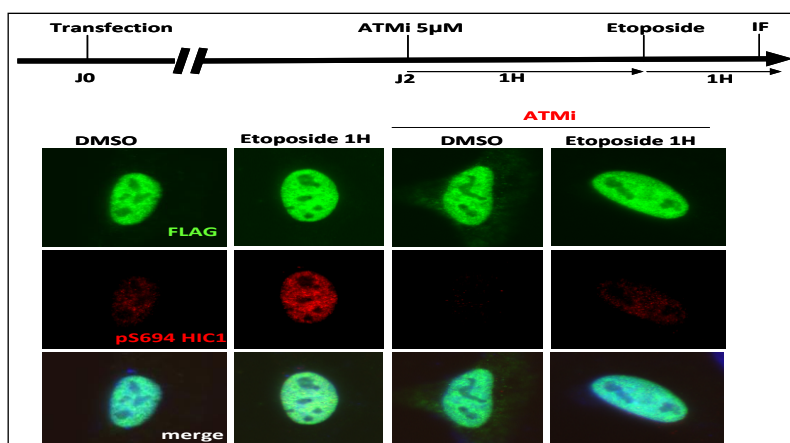
ATM dans ce processus puisque l'inhibition pharmacologique de la sous unité catalytique de la kinase DNAPK n'influence pas le niveau de phosphorylation de la protéine HIC1 par rapport aux cellules non traitées alors que l'inhibition de la kinase ATM le diminue fortement (Figures 44A et 44B, pistes 6 à 11, encadré rouge).



**Figure 44 :** Cinétique de Phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN en présence ou non de l'inhibiteur de DNAPKcs (44A) ou de l'inhibiteur d'ATM (44B)

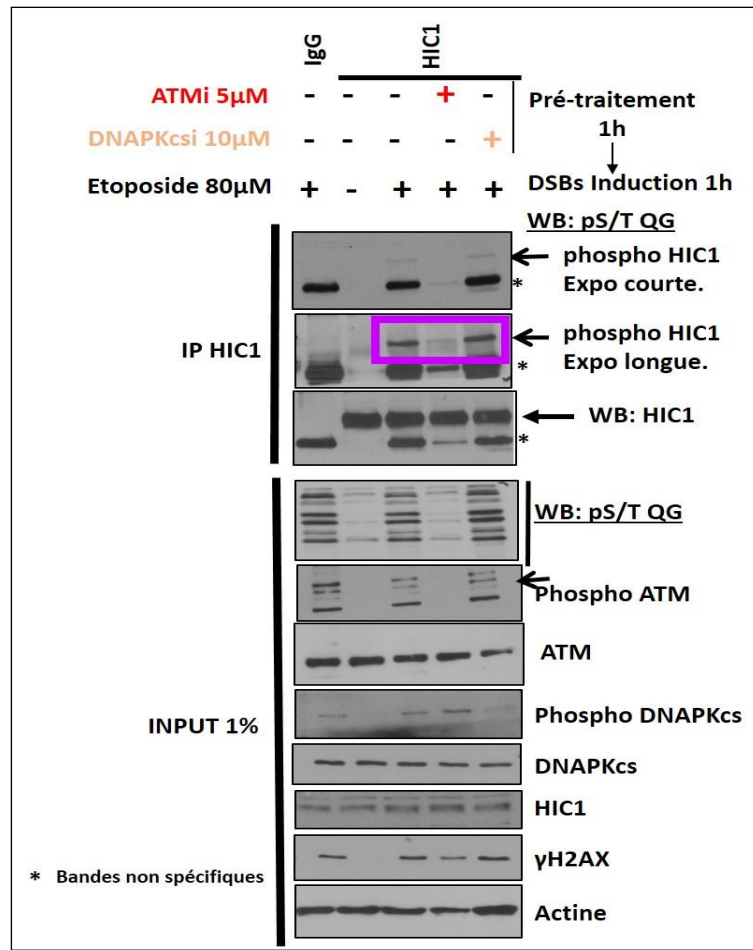
Ensuite, nous avons confirmé par une technique différente des analyses en western blot que la protéine HIC1 est phosphorylée sur la Sérine 694 en réponse aux dommages à l'ADN réparables par la kinase ATM, en réalisant des expériences d'immunofluorescence. Après un traitement Etoposide de 1h et en présence d'inhibiteur de la kinase ATM, la protéine HIC1 est toujours nucléaire mais n'est plus phosphorylée en S694 (Figure 45).





**Figure 45 :** Validation de l'implication de la kinase ATM dans la phosphorylation de la protéine HIC1 par immunofluorescence

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer la stricte dépendance de la kinase ATM dans la phosphorylation de la protéine HIC1 endogène. Pour cela, nous avons choisi d'inhiber les kinases ATM et DNAPKcs par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de chacune d'elles puis, induit des dommages à l'ADN avant d'effectuer des expériences d'enrichissement nucléaire et d'immunoprécipitation dans des fibroblastes humains BJ-hTert. Nos résultats confirment que la protéine HIC1 est phosphorylée par la kinase ATM et non par la sous unité catalytique DNAPKcs en réponse aux DSBs (Figure 46, pistes 4 à 6, encadré violet). En effet, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de la protéine kinase ATM (KU-55933) ne nous permet plus de détecter la forme phosphorylée de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN alors que la présence de l'inhibiteur de DNAPKcs ne perturbe en aucune façon la détection de celle-ci (Figure 46, pistes 5 et 6, encadré violet). L'efficacité des traitements est visualisée par la perte de phosphorylation de la kinase ATM (Figure 46, piste 4) et une diminution de la forme phosphorylée de la marque  $\gamma$ H2AX (Figure 46, piste 4) pour l'inhibiteur spécifique de la kinase ATM, et par la perte de phosphorylation de la Sérine 2056 de la sous unité catalytique DNAPKcs (Figure 46, piste 5) pour l'inhibiteur spécifique de DNAPKcs.

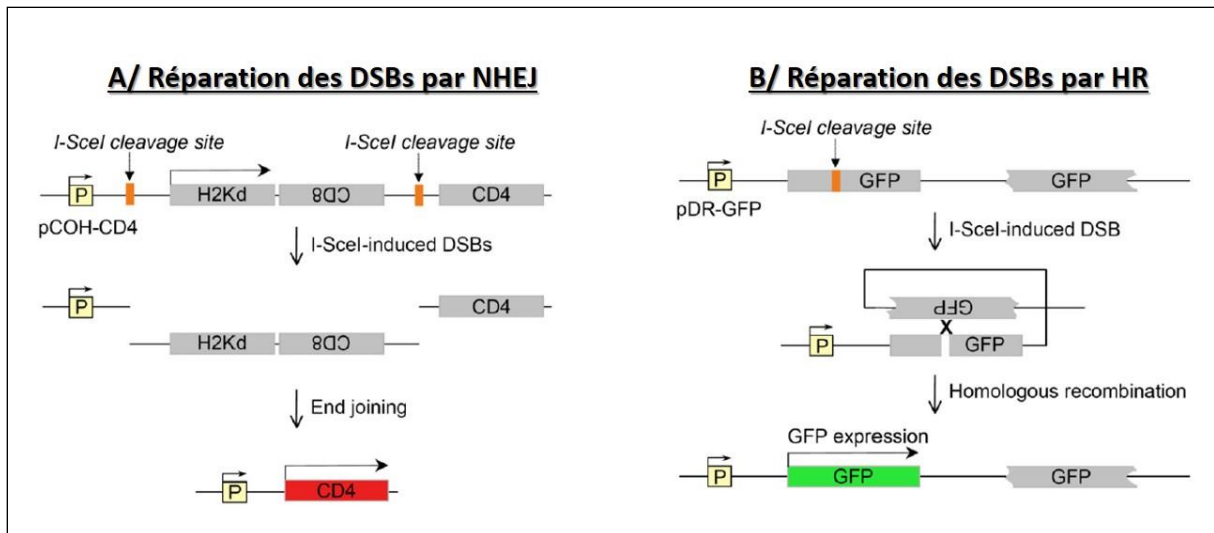


**Figure 46 :** Phosphorylation endogène de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables dans les fibroblastes humains BJ-hTert par la kinase ATM

### 3/ La protéine HIC1 n'est pas directement impliquée dans la réparation des DSBs par NHEJ ou HR

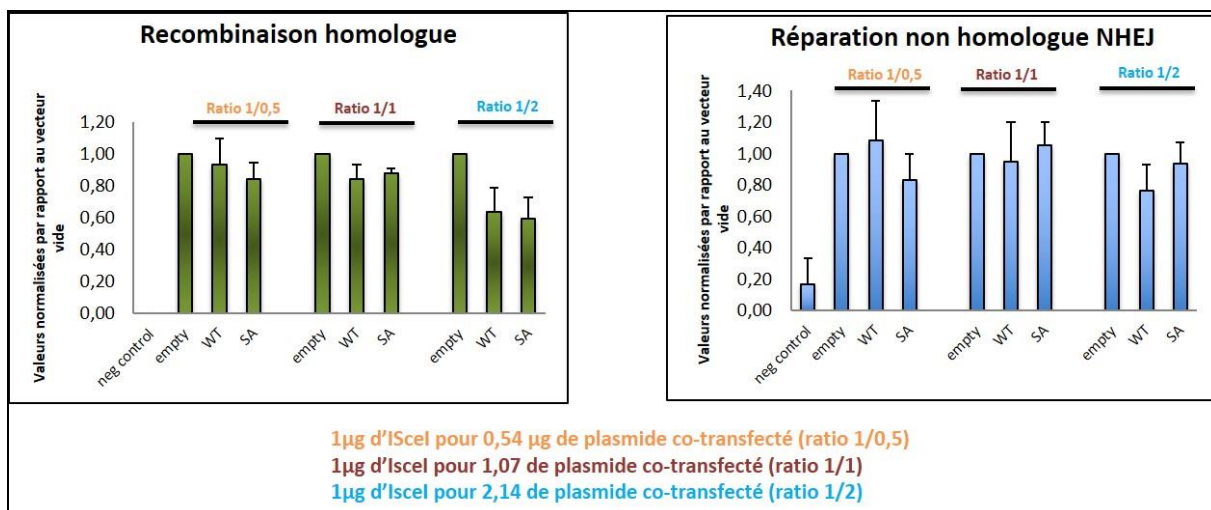
Afin d'élucider la signalisation par laquelle les modifications post-traductionnelles de la protéine HIC1 permettent la réparation des cassures double brin, nous avons collaboré avec le Dr Josée Guirouilh-Barbat, qui travaille au sein de l'UMR8200 « Stabilité Génétique et Oncogenèse » dans l'équipe : « Recombinaison-Réparation et Cancer » dirigée par le Dr B. Lopez.

Grace à nos plasmides permettant la production de la protéine HIC1 WT et HIC1S694A et par des techniques *in vitro* permettant de déterminer l'implication de la recombinaison homologue ou de la NHEJ au cours de la réparation des dommages induit notamment par l'utilisation d'une nucléase I-Sce1 (Figure 47), l'équipe de Josée Guirouilh-Barbat a pu déterminer si la protéine HIC1 permettait la réparation par NHEJ ou par HR.



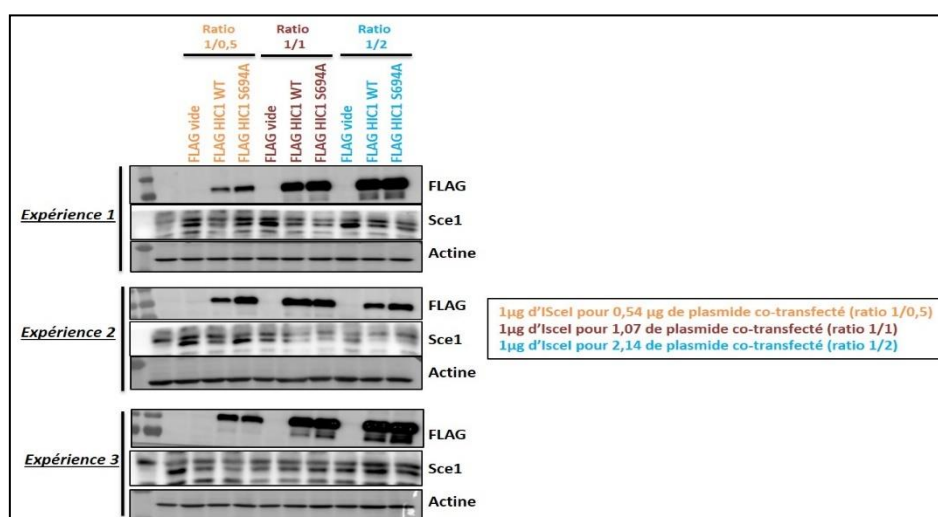
**Figure 47 :** Représentation schématique de la réparation des DSBs par NHEJ (A) ou par HR (B) induit par l'enzyme I-Sce1 (Mamouni et al., 2014)

Pour déterminer si la protéine HIC1 jouait un rôle dans la réparation par NHEJ, un plasmide contenant un gène codant pour la protéine CD4 a été transfecté dans les cellules U2OS. Au niveau de celui-ci, une construction située entre le promoteur pCOH-CD4 et le gène codant la protéine CD4 bordée par deux sites de coupure de l'enzyme I-Sce1 empêche l'expression de celle-ci. I-Sce1 est une méganucléase reconnaissant un site de coupure de 18 paires de bases, donc peu fréquent dans le génome. Suite à l'induction de DSBs par l'action de l'enzyme I-Sce1, la réparation des dommages à l'ADN par NHEJ sera détectée par la présence de la protéine CD4 (Figure 47 A). De même, pour déterminer si la protéine HIC1 jouait un rôle dans la réparation par HR, un plasmide contenant deux copies du gène codant pour la protéine GFP dont une copie du gène possède un site de coupure pour l'enzyme I-Sce1 a été transfecté dans les cellules U2OS. Ainsi, après l'induction de DSBs par l'enzyme I-Sce1, la réparation des dommages à l'ADN par HR sera détectée par la présence de la protéine GFP (Figure 47B). En réalisant des expériences à l'aide de ces deux systèmes expérimentaux, l'équipe de Josée Guirouilh-Barbat a conclu sur l'absence d'effet de la surexpression de la protéine HIC1 (WT ou S694A) sur l'efficacité de réparation par HR et NHEJ (Figure 48).



**Figure 48 :** Absence d'effet de la surexpression de HIC1 (WT ou S694A) sur l'efficacité de réparation par HR et NHEJ (d'après Josée Guirouilh-Barbat)

Etant donné que la protéine HIC1 est un répresseur transcriptionnel, un contrôle important était de vérifier que HIC1 ne réprimait pas la transcription du plasmide exprimant l'enzyme I-Sce1 qui génère les coupures. Les analyses en western blot réfutent cette hypothèse (Figure 49). En effet, on retrouve des niveaux d'expression satisfaisants de l'enzyme I-Sce1 même en présence des différents plasmides surexprimant HIC1.



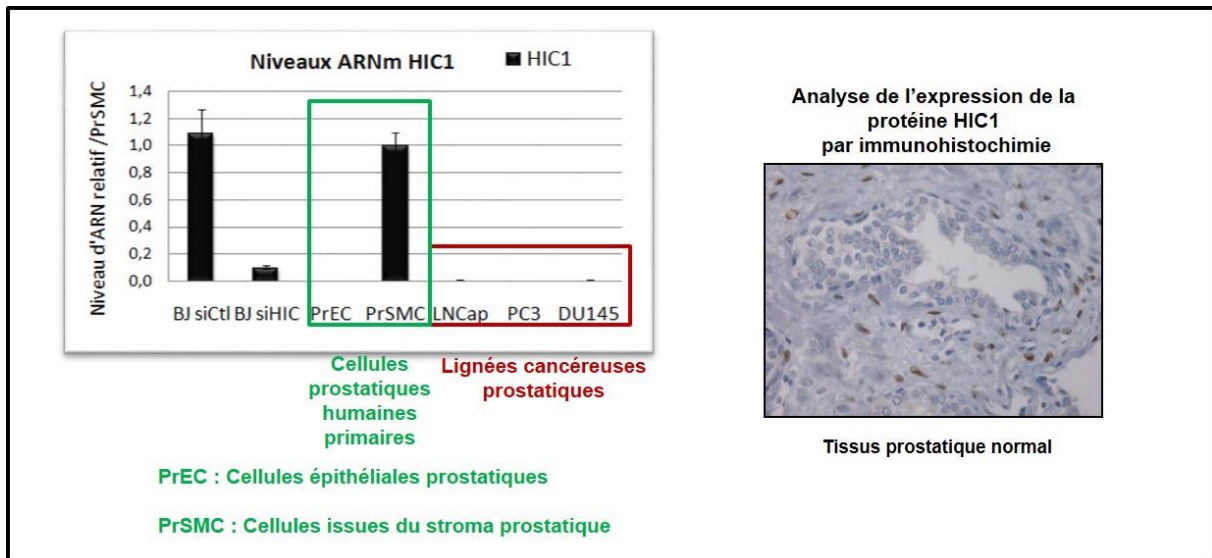
**Figure 49 :** La protéine HIC1 ne semble pas réprimer de façon significative l'expression de l'enzyme I-Sce1

Ces résultats suggèrent donc que HIC1 ne régulerait pas la réparation des DSBs par NHEJ ou par HR. Cependant, d'après nos résultats d'essais comètes, la protéine HIC1 semblerait avoir un rôle au niveau de la cinétique de réparation, or ces systèmes d'induction de DSBs par coupure enzymatique via I-Sce1 ne permettent pas de détecter un effet quel qu'il soit au niveau de la cinétique de réparation des DSBs. De même, si les effets ont lieu sur le "nettoyage" des cassures (première étape de la réparation des cassures double brin), ces systèmes ne permettent pas de les détecter.

Ainsi, nous devons poursuivre nos investigations afin de découvrir par quel(s) mécanisme(s) les modifications post-traductionnelles de HIC1 et notamment la phosphorylation de la Sérine 694 contribuent à la réparation de DSBs.

### **III/ Etude des MPTs de la protéine HIC1 dans un nouveau modèle cellulaire : les cellules fibroblastiques prostatiques : WPMY-1**

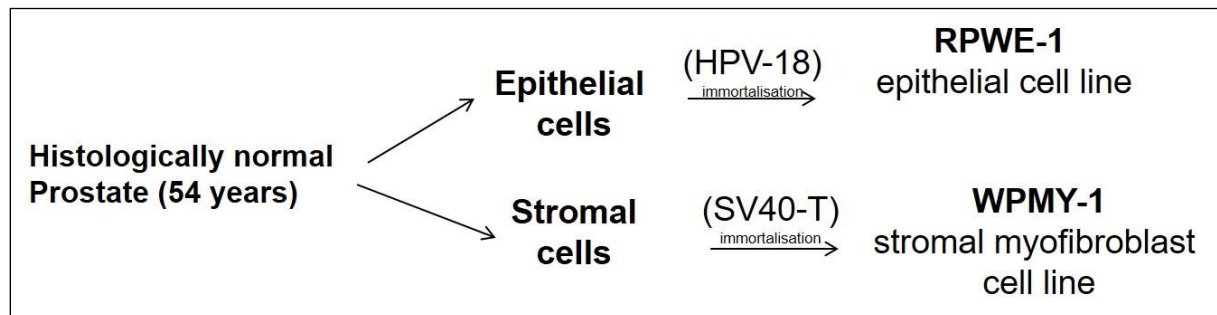
Les données récentes du laboratoire obtenues en collaboration avec le Professeur Xavier Leroy (C2RC, CHU Lille) ont démontré que la protéine HIC1 s'exprimait seulement au niveau du stroma prostatique (PrSMC) et non dans les cellules épithéliales (PrEC) comme nous le montre les résultats d'immunohistochimie et de qRT-PCR de la Figure 50. Les relations stroma-épithélium sont très importantes pour l'homéostasie prostatique et sont bien souvent dérégulées lors du développement de nombreux cancers dont le cancer de la prostate. En effet, les données de la littérature indiquent que le gène *HIC1* est hyperméthylé dans les hyperplasies bénignes de la prostate et à 95% dans les cancers de la prostate (Yamanaka et al., 2003). De plus, il a été clairement montré que l'extinction du gène *HIC1* par hyperméthylation de son promoteur peut influencer l'initiation et la progression tumorale *in vivo* (Chen et al., 2003 ; 2004). Avec l'âge, des mécanismes d'inflammation chronique de la prostate aboutissent à un stress oxydatif responsable de l'induction de dommages à l'ADN. Ainsi une meilleure compréhension des mécanismes d'action du gène *HIC1* dans des conditions de dommages à l'ADN et notamment dans le cas de cassures double brin permettrait de mieux comprendre comment son extinction promeut la progression tumorale.



**Figure 50 :** Etude de l'expression de HIC1 au niveau prostatique par des RT-qPCR et des analyses d'immunohistochimie (collaboration avec le Pr Xavier Leroy, C2RC, CHU Lille)

Nous avons donc choisi d'étudier les MPTs de la protéine HIC1 dans une lignée cellulaire prostatique issue du stroma, les WPMY1.

Les WPMY-1 sont des cellules myo-fibroblastiques humaines immortalisées. Elles proviennent du stroma prostatique et sont issues de la même prostate que la lignée épithéliale RPWE1 qui est très souvent utilisée (Figure 51).

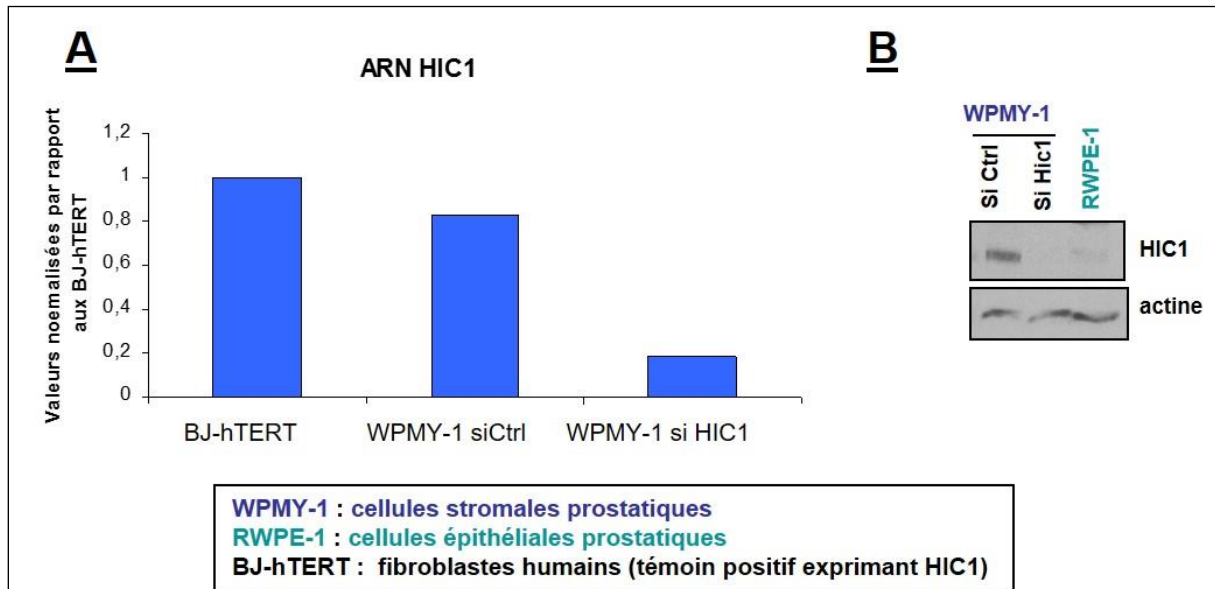


**Figure 51 :** Origine des lignées cellulaires WPMY-1 et RPWE1 (Weber et al., 2013)

### 1/ Validation du modèle cellulaire les WPMY-1

Dans un 1<sup>er</sup> temps, par des expériences d'ARN interférence suivies d'analyses par qRT-PCR et par Western blot (Figure 52), nous avons vérifié et confirmé que ces cellules exprimaient bien notre protéine d'intérêt. En effet, lorsque l'on inhibe l'expression de *HIC1* par l'utilisation de siRNA nous ne détectons plus l'expression de

*HIC1* par qRT-PCR et par WB dans les WPMY-1 (Figure 52). Nous montrons également que les cellules épithéliales RWPE-1 associées aux WPMY-1 n'expriment pas la protéine HIC1 (Figure 52B) ce qui confirme les résultats de qRT PCR (Figure 52A) sur les cellules primaires et le résultat d'immunohistochimie.

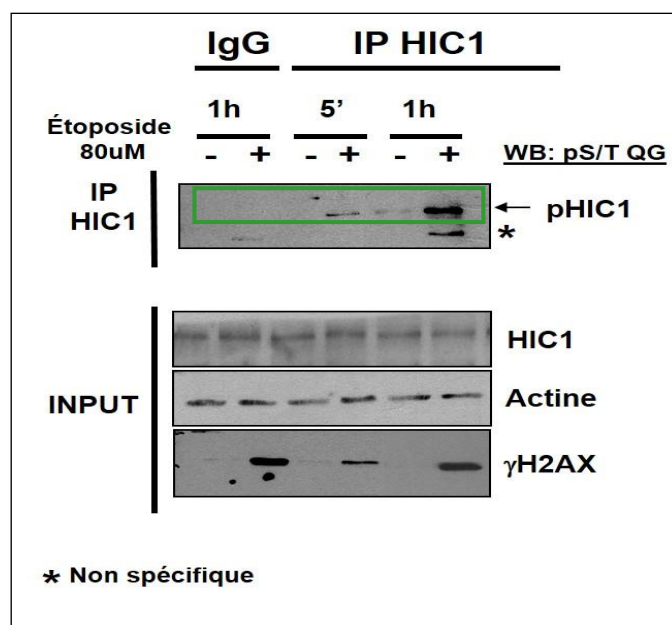


**Figure 52 :** Les cellules stromales prostatiques WPMY-1 expriment la protéine HIC1

## 2/ Etude de la phosphorylation de la protéine HIC1 en réponse aux DSBs

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux MPTS de la protéine HIC1 et notamment la phosphorylation de la Sérine 694 en réponse aux DSBs réparables dans ce modèle de cellules stromales prostatiques. Pour cela, après avoir induit des dommages à l'ADN, nous avons effectué des expériences d'enrichissement nucléaire et d'immunoprécipitation dans les WPMY-1. Grâce à un anticorps dirigé contre les substrats phosphorylés des kinases ATM/ATR pS/T QG, nos résultats confirment, que dans ce nouveau modèle cellulaire, la protéine HIC1 est également phosphorylée très rapidement en réponse aux DSBs (Figure 53, encadré vert).

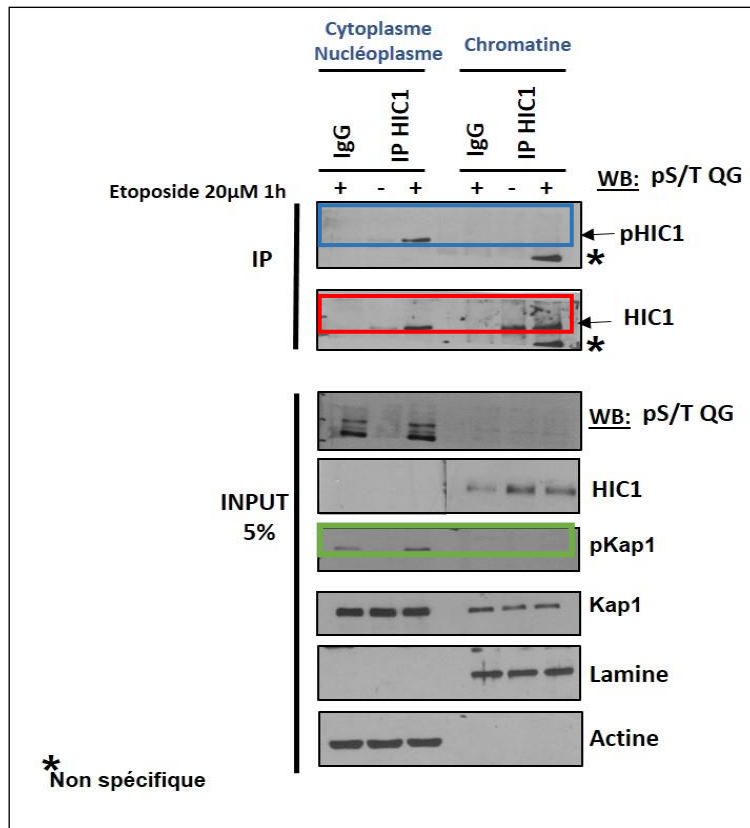




**Figure 53 :** La protéine HIC1 endogène dans les WPMY-1 est phosphorylée très rapidement en réponse aux DSBs

Pour essayer de déterminer le rôle de la phosphorylation de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitation dans les cellules WPMY-1 dans lesquelles nous avons effectué au préalable un fractionnement cellulaire afin de séparer la fraction chromatinienne de la fraction cytoplasmique/nuéoplasmique (Figure 54). Après avoir immunoprécipité la protéine endogène HIC1, nous avons réalisé des analyses par Western blot permettant ainsi de déterminer la fraction dans laquelle nous pouvions détecter la forme phosphorylée de la protéine HIC1 suite à l'induction de cassures double brin. Nos résultats démontrent que la forme phosphorylée de la protéine HIC1 se localise quasi-exclusivement au niveau de la fraction cytoplasmique/nuéoplasmique et non dans la fraction chromatinienne (Figure 54, encadré bleu). De plus, nous remarquons qu'en absence de dommages à l'ADN, la protéine HIC1 se localise principalement au niveau de la fraction chromatinienne et de façon intéressante, on constate une augmentation significative de la proportion de la protéine HIC1 au niveau cytoplasmique/nuéoplasmique suite à l'induction de DSBs (Figure 54, encadré rouge).

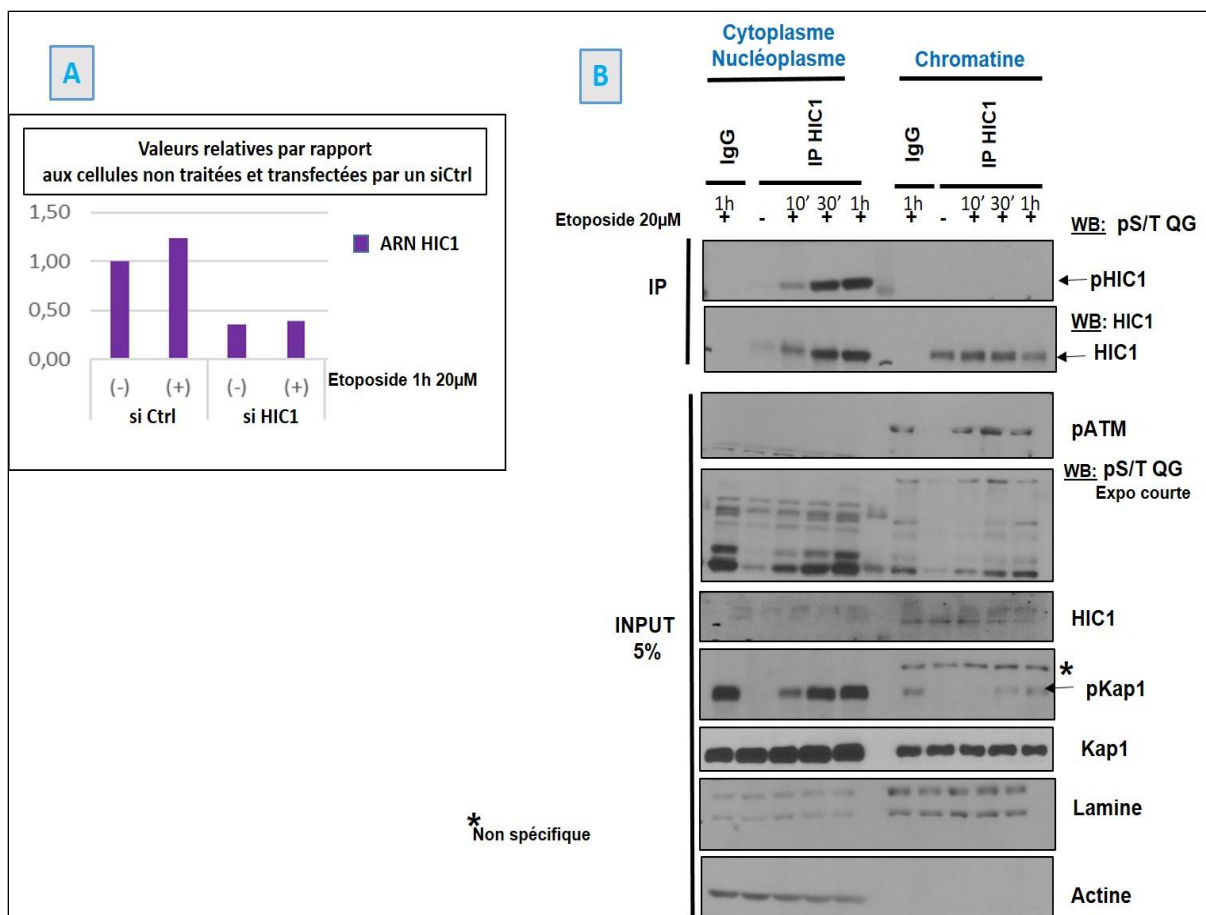




**Figure 54 : Localisation de la forme phosphorylée de la protéine endogène HIC1 suite à l'induction de DSBs dans les WPMY-1**

Pour valider nos résultats, nous avons vérifié la localisation de la forme phosphorylée de la protéine Kap1 (Figure 54, encadré vert) puisque les données de la littérature démontrent qu'en réponse aux dommages à l'ADN la protéine Kap1 est phosphorylée par la kinase ATM induisant son « décrochage » de l'hétérochromatine par un mécanisme de relaxation de la chromatine pour aller se localiser au niveau du nucléoplasme permettant ainsi un accès facilité aux protéines de réparation (voir chapitre III de Introduction, partie 4.1).

Une cinétique d'induction de DSBs a également été effectuée dans ces mêmes conditions de fractionnement cellulaire afin de déterminer si l'on pouvait détecter un « déplacement » de la forme phosphorylée de la protéine HIC1 de la fraction chromatiniennne vers le compartiment cytoplasmique/nuéoplasmique (Figure 55B). Nos résultats semblent en faveur de cette hypothèse. De plus, la phosphorylation de la protéine endogène HIC1 détectée par l'anticorps pS/TQG est un évènement très rapide puisque l'on peut la visualiser par Western blot seulement après 5 à 10 minutes d'induction de DSBs (Figures 53 et 55B).



**Figure 55 : Cinétique de phosphorylation endogène de la protéine HIC1 dans les cellules WPMY-1 au cours de l'induction de dommages réparables à l'ADN après un fractionnement cellulaire**

Nous avons également effectué une RT-qPCR pour déterminer si la quantité d'ARN HIC1 était augmentée en présence de DSBs (Figure 55A). Nos résultats montrent que l'induction de DSBs par le biais d'un traitement Etoposide de 1H n'influe pas de manière significative sur le niveau d'ARN de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN.

### **3/ Implication transcriptionnelle de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN dans les cellules WPMY-1**

Afin d'essayer de déterminer le rôle de la protéine HIC1 dans le processus de réparation, nous avons également étudié son éventuelle implication dans la régulation transcriptionnelle d'un ensemble de gènes impliqués dans la réparation par analyse transcriptomique ciblée sur un panel de gènes. Pour cela, des expériences d'ARN interférence utilisant soit un pool de siRNAs ciblant *HIC1* ou soit un siRNA contrôle ont été effectuées. A la suite de ces expériences, nous avons induit des DSBs pendant 1h

puis laissé les cellules réparer les dommages pendant 4h, temps pour lequel nous observons un effet significatif de l'inhibition de la protéine endogène HIC1 dans les BJ-hTert (Dehennaut et al., 2013), ou de sa surexpression pour la réparation des dommages comme nous le montrent les essais comètes après surexpression des protéines HIC1 WT et HIC1S694A dans les cellules Cos7 (Figure 42). Après extraction des ARNs avec le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel), ceux-ci ont été ensuite transcrits en ADNc puis déposés sur une plaque de type RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array « Human DNA Damage Signaling Pathway » commercialisé par Qiagen. Celle-ci contient des oligonucléotides permettant de détecter par PCR l'expression de 89 gènes (Figure 56) impliqués dans les différents mécanismes de réparation des dommages à l'ADN mais également dans la signalisation du cycle cellulaire ou encore dans l'induction de l'apoptose.

<p><b>Signalisation ATM / ATR</b>  ATM, ATR, ATRIP, BARD1, BRCA1, CDC25A, CHEK1, CHEK2 (RAD53), CSNK2A2, FANCD2, H2AFX, HUS1, MDC1, PARP1 (ADPRT1), RAD1, RAD17, RAD50, RAD9A, RBBP8, RNF168, RNF8, SMC1A (SMC1L1), TOPBP1, TP53 (p53).</p> <p><b>Signalisation et réparation des dommages</b></p> <p><b>Nucleotide Excision Repair (NER):</b> CDK7, DDB1, DDB2, ERCC1, ERCC2 (XPB), LIG1, NTHL1, OGG1, PCNA, PNKP, RPA1, SIRT1, TP53 (p53), XPA, XPC.</p> <p><b>Base Excision Repair (BER):</b> APEX1, FEN1, LIG1, MBD4, MPG, NTHL1, OGG1, PARP1 (ADPRT1), PCNA, TP53 (p53), UNG, XRCC1.</p> <p><b>Mismatch Repair (MMR):</b> ABL1, EXO1, MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, PCNA, PMS1, PMS2, TP73.</p> <p><b>Double-Strand Break (DSB) Repair:</b> ATM, BLM, BRCA1, CHEK1, H2AFX, HUS1, LIG1, MDC1, MLH1, MRE11A, NBN (NBS1), PRKDC, RAD50, RAD51, RPA1, TP53BP1, XRCC2, XRCC6 (G22P1).</p> <p><b>Other DNA Repair Genes:</b> ATR, ATRIP, ATRX, BARD1, BRIP1, CHEK2 (RAD53), CIB1, CRY1, FANCA, FANCD2, FANCG, GADD45A, GADD45G, RAD1, RAD17, RAD18, RAD21, RAD51B (RAD51L1), RAD9A, RBBP8, REV1 (REV1L), RNF168, RNF8, SMC1A (SMC1L1), SUMO1, TOPBP1, XRCC3.</p> <p><b>Apoptose</b>  ABL1, ATM, BARD1, BAX, BBC3, BRCA1, CDKN1A (p21CIP1, WAF1), CHEK2 (RAD53), CIB1, CSNK2A2, PPP1R15A (GADD34), PRKDC, RAD21, RAD9A, SIRT1, TP53 (p53), TP73.</p> <p><b>Cycle cellulaire</b>  ATM, ATR, ATRIP, CDC25A, CDC25C, CDK7, CDKN1A (p21CIP1, WAF1), CHEK1, CHEK2 (RAD53), DDIT3 (GADD153, CHOP), MAPK12 (P38GAMMA), MCPH1, MDC1, PPM1D, PPP1R15A (GADD34), TP53 (p53), TP73.</p>
--

**Figure 56 :** Liste des gènes présents sur la plaque PCR arrays « Human DNA Damage Signaling Pathway » commercialisée par QUIAGEN

Pour pouvoir interpréter ces résultats, dans un premier temps, nous avons comparé l'expression de ces différents gènes entre les cellules exprimant la protéine HIC1 (si Ctrl) et celles ne l'exprimant plus (si HIC1), puis nous avons regardé s'il existait des différences d'expression dans deux conditions différentes :

-1<sup>ère</sup> condition : les cellules ont été traitées pendant 1h à l'Etoposide et lysées directement « sans recovery » afin d'avoir les gènes dérprimés en absence de HIC1 (Figure 57).

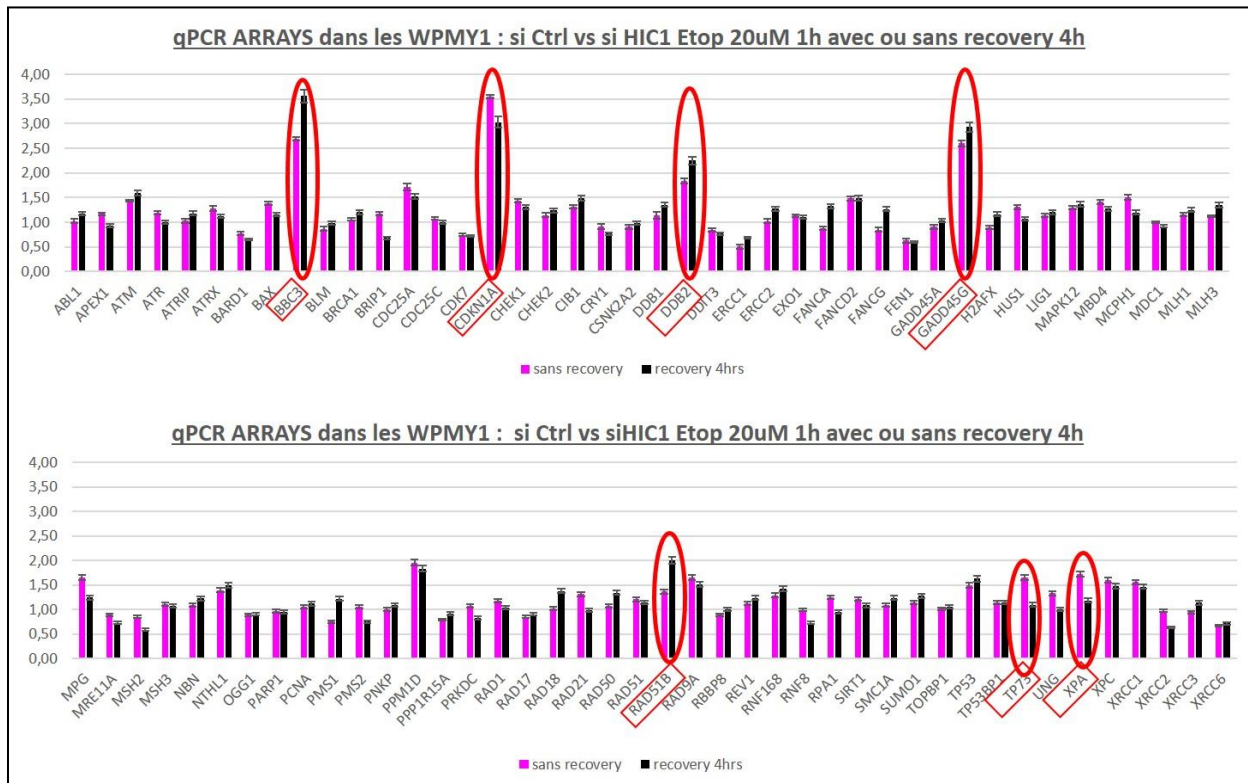


**Figure 57 :** Variabilité d'expression de différents gènes impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN entre les conditions siCtrl vs siHIC1 dans des cellules WPMY-1 traitées à l'Etoposide pendant 1H

-2<sup>ème</sup> condition : les cellules ont été traitées à l'Etoposide pendant 1h puis ré-incubées dans un milieu normal pendant 4h (« Recovery »). Ceci nous permettra de visualiser les gènes dont la répression reste élevée voire accrue en absence de HIC1 après 4h de recovery. Ces gènes seraient donc potentiellement impliqués dans le « retard de réparation » observé en présence de siHIC1.

Nos résultats montrent des différences d'expression de plusieurs gènes (Figure 58, ovales rouge) impliqués dans différentes voies de signalisations comme la protéine

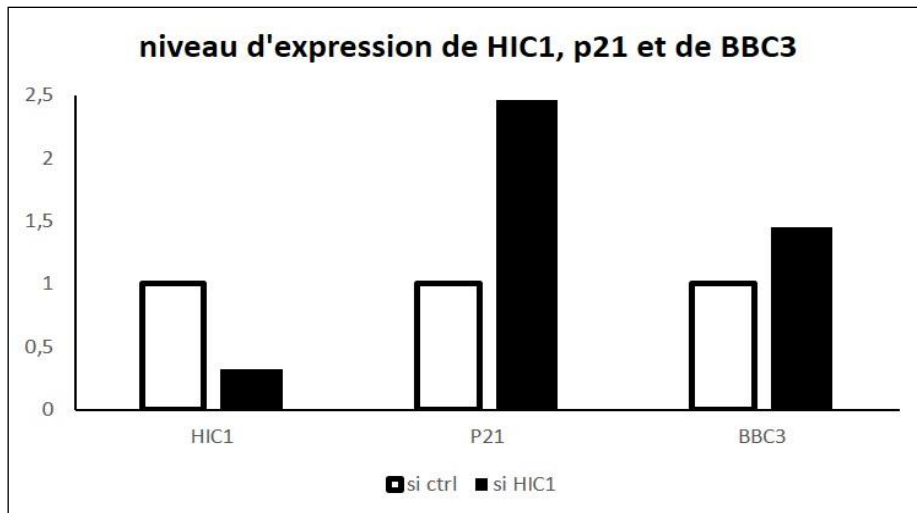
BBC3 (Bcl2 Binding Component 3) aussi connue sous le nom de PUMA (P53 Up regulated Modulator of Apoptosis) impliquée dans l'induction de l'apoptose, ou encore CDKN1A (p21) impliquée dans la régulation des checkpoints du cycle cellulaire. Ces deux gènes sont directement régulés par la protéine p53 en réponse aux dommages à l'ADN pour bloquer le cycle cellulaire et induire l'apoptose.



**Figure 58 : Variabilité d'expression de différents gènes impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN entre les conditions siCtrl vs siHIC1 dans des cellules WPMY-1 traitées à l'Etoposide pendant 1H suivi d'une ré-incubation ou non en milieu normal pendant 4 h**

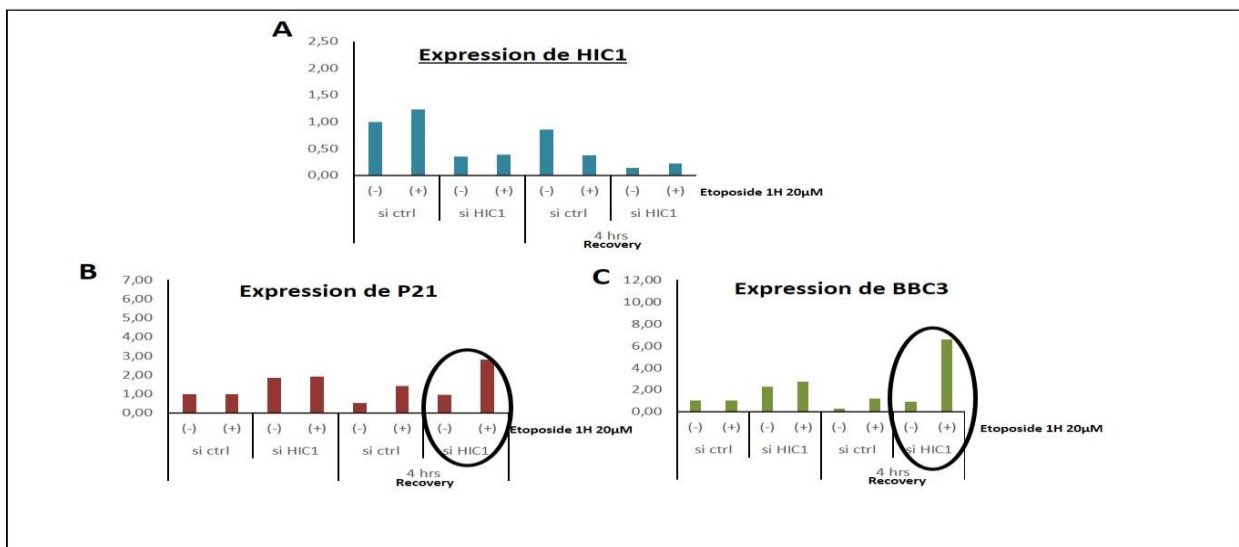
Dans un second temps nous avons vérifié si le gène BBC3 était bien une cible transcriptionnelle de la protéine HIC1. Pour cela, des expériences d'ARN interférence utilisant soit un pool de siRNAs ciblant *HIC1* ou soit un siRNA contrôle ont été effectuées. A la suite de cela, des RT-qPCR ciblant les gènes BBC3 et p21 utilisé comme contrôle positif (Dehennaut et al., 2013) ont été réalisées (Figure 59). Nos résultats confirment les données de PCR arrays puisque l'extinction de l'expression du gène *HIC1* dans les cellules WPMY-1 augmente l'expression de p21 de 2.5 fois et l'expression de BBC3 de 1.5 fois par rapport aux cellules WPMY-1 qui expriment toujours la protéine HIC1.





**Figure 59 :** Niveau d'expression de p21 et de BBC3 suite à l'extinction du gène *HIC1* par ARN interférence dans les cellules WPMY-1

Pour finir, nous avons également étudié l'expression de ces différents gènes p21 et BBC3 suite à l'induction de DSBs dans des conditions où les cellules ont été remises en culture pendant 4 heures ou non (Recovery) et dans lesquelles nous avons invalidé ou non le gène *HIC1* (Figure 60). Lorsque le gène *HIC1* est invalidé, nous observons une augmentation significative de l'expression de p21 de 3 fois, et de BBC3 de 7 fois dans la condition où nous avons induit des DSBs puis changé le milieu de culture afin de laisser les cellules réparer les dommages (Figure 60, encadré noir) en comparaison avec les cellules qui expriment toujours *HIC1*.



**Figure 60 :** *HIC1* réprime l'expression de p21 et de BBC3 en réponse aux dommages à l'ADN

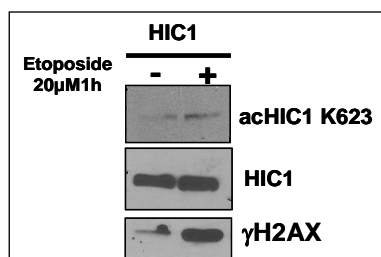
HIC1 réprime donc *P21* et *BBC3* qui sont deux gènes cibles directs de P53 induits lors de la détection de dommages à l'ADN. P21 est un gène cible direct de HIC1 (Dehennaut et al., 2013). Il sera très intéressant de déterminer si BBC3/PUMA est aussi un gène cible direct de HIC1.





## Résultats complémentaires

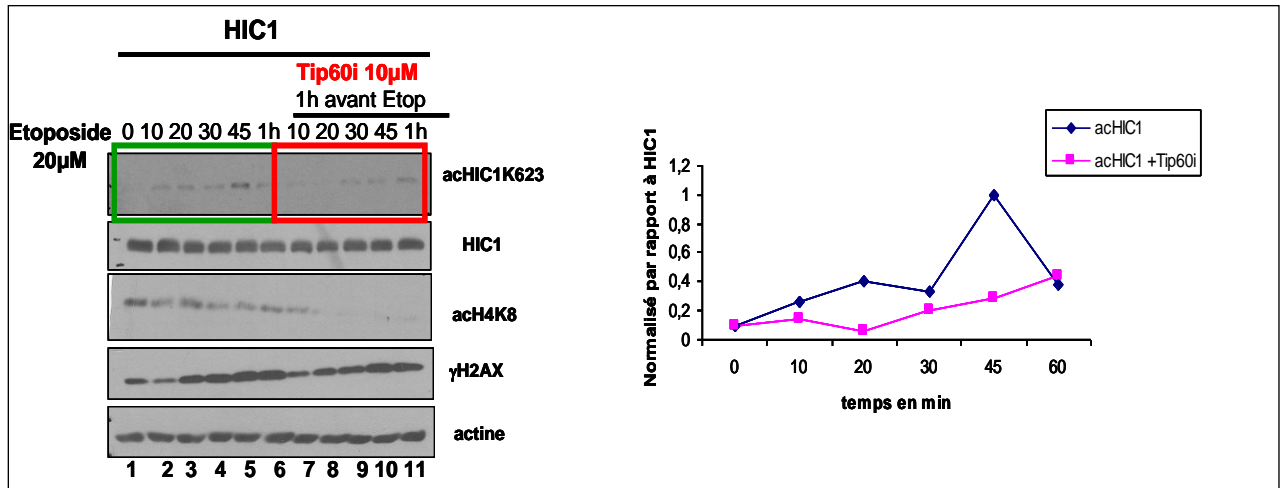
Outre la phosphorylation de la Sérine 694, l'étude de protéomique réalisée en collaboration avec le Dr Adeline Page a également identifié un site d'acétylation sur la Lysine 623 qui pourrait être un site consensus d'acétylation par Tip60, une acétyl-transférase impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Les consensus pour les acétyl-transférases sont moins bien caractérisés que ceux pour les kinases. Dans la littérature, il est bien décrit que la protéine Tip60 est importante pour la signalisation des cassures double brin en participant à l'activation de la kinase ATM via son acétylation sur la Lysine 3016 (Sun et al., 2005 ; Sun et al., 2007). De plus, il a été montré que l'acétylation de la kinase ATM précède sa phosphorylation. Ainsi, Tip60 est donc essentielle pour l'activation de la kinase ATM. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si cette Lysine 623 de HIC1 était acétylée en réponse aux DSBs. Pour cela après avoir surexprimé la protéine HIC1 par transfection transitoire, nous avons induit des dommages à l'ADN réparables par le biais d'un traitement Etoposide de 1H, nous avons montré grâce à l'obtention d'un anticorps spécifique de l'acétylation de la lysine 623 (Covalab) que la protéine HIC1 est bien acétylée sur la Lysine 623 en réponse aux DSBs réparables (Figure 61).



**Figure 61 : Acétylation de la Lysine 623 en réponse aux DSBs**

Ensuite, comme pour la phosphorylation de la Sérine 694, nous avons voulu déterminer le profil d'acétylation de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables. Nous nous sommes également intéressés à l'implication de Tip60 dans l'acétylation de la Lysine 623 puisque l'équipe a montré que HIC1 interagissait avec celle-ci (Van Rechem et al., résultats non publiés). Pour cela, après avoir surexprimé la protéine HIC1, nous avons effectué une cinétique d'induction de DSBs

par le biais de différents temps de traitement Etoposide (20 $\mu$ M) dans les cellules HEK 293T pré traitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique, ciblant spécifiquement l'acétyl-transférase Tip60 (Tip60i) (Figure 62).

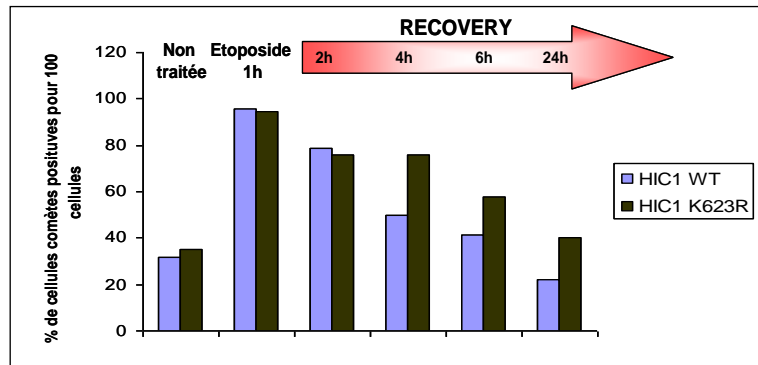


**Figure 62 : Cinétique d'acétylation de la Lysine 623 de la protéine HIC1 au cours de l'induction de dommages à l'ADN**

Nous avons pu montrer que la protéine HIC1 est acétylée avec un maximum après 45 minutes d'induction de dommages à l'ADN (Figure 62, pistes 1 à 6, encadré vert). De plus, nous confirmons l'implication de l'acétyl-transférase Tip60 dans ce processus puisque l'inhibition pharmacologique de celle-ci se traduit par une perte totale d'acétylation de la Lysine 623 de la protéine HIC1 en réponse aux DSBs (Figure 62, pistes 7 à 11, encadré rouge). L'efficacité de ce traitement est vérifiée par la perte d'acétylation de la Lysine 8 de l'histone H4, un substrat connu de l'acétyl-transférase Tip60.

Dans un second temps, afin de déterminer l'importance de l'acétylation de la lysine 623 au cours de la réparation des cassures double brin, un mutant ponctuel de HIC1 non acétylable HIC1K623R a été créé.

Après avoir surexprimé les protéines HIC1 WT et HIC1 HIC1K623R dans les cellules Cos 7 puis induit des dommages à l'ADN réparables, nous avons réalisé des expériences d'essais comètes. Nos résultats préliminaires semblent montrer que l'acétylation de la Lysine 623 joue également un rôle dans le processus de réparation des DSBs (Figure 63), bien que l'effet soit beaucoup moins marqué que dans le cas de la Sérine 694.



**Figure 63 :** Représentation schématique d’essais comètes réalisés après surexpression de la protéine HIC1 WT et HIC1 K623R

En effet, comme nous pouvons le voir sur la Figure 28, la réparation des cassures double brin induites par le traitement Etoposide est plus lente dans les cellules surexprimant la protéine mutée HIC1K623R par rapport aux cellules surexprimant la protéine WT. Cependant, nous devons reproduire ces résultats afin de conclure définitivement sur l’importance de l’acétylation de la Lysine 623 au cours de la réparation des DSBs.



## **Discussion générale**

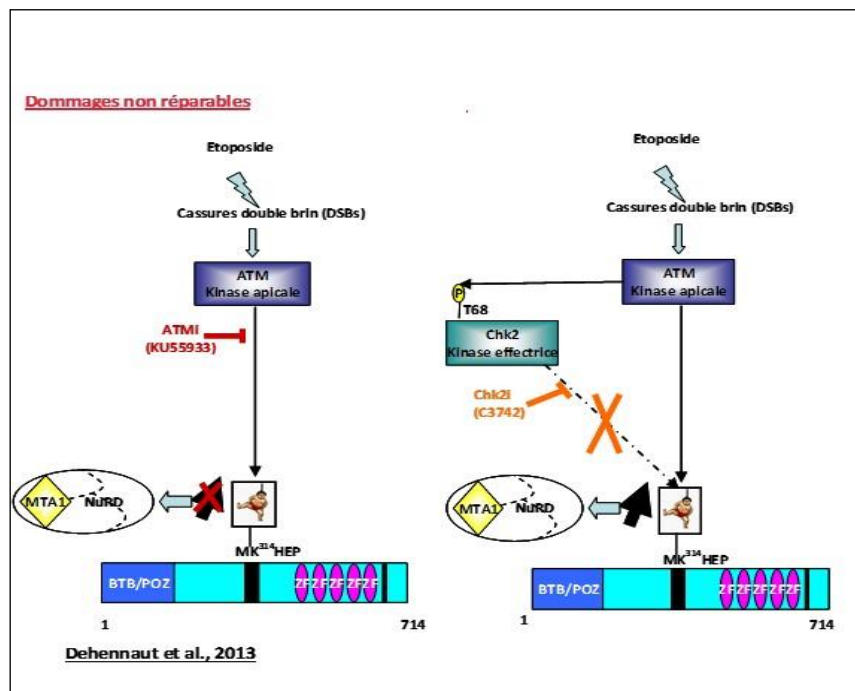
Mon travail de thèse a concerné l'étude du rôle de HIC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN : d'une part sa participation à la réponse transcriptionnelle permettant de faciliter la réponse apoptotique dépendante de P53 dans le cas de dommages non réparables (Chen et al., 2005) et d'autre part lors du processus de réparation (Dehennaut et al., 2013). Ceci a impliqué la caractérisation de la fonction de modifications post-traductionnelles de HIC1 en réponse aux DSBs, notamment la SUMOylation de la Lysine 314 mais également la caractérisation et l'étude fonctionnelle de nouvelles modifications post traductionnelles de HIC1 lors de l'induction de dommages réparables. En effet, la phosphorylation de la Sérine 694 et l'acétylation de la Lysine 623 situées au niveau C-terminal de la protéine HIC1 ont été identifiées spécifiquement en réponse aux DSBs réparables dans les HEK 293T grâce à une étude de protéomique réalisée en collaboration avec le Dr Adeline Page (IGBMC, Strasbourg).

Mon travail de thèse a donc concerné la détermination des conséquences fonctionnelles de ces MPTs sur l'activité de HIC1 dans les conditions de dommages à l'ADN réparables et non réparables.

### 1/ Les modifications post traductionnelles de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN non réparables

Précédemment, l'équipe a montré que dans des conditions de dommages apoptotiques, l'augmentation de SUMOylation de HIC1 était dépendante de la kinase ATM (Dehennaut et al. 2013). En effet, lorsque la cellule détecte des dommages à l'ADN, elle déclenche une série de processus moléculaires constituant la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) impliquant entre autres, la kinase activatrice ATM et la kinase effectrice Chk2 (substrat d'ATM) pour réparer si possible les dommages perçus. Afin de caractériser plus précisément les mécanismes impliqués dans cette augmentation de SUMOylation, nous avons effectué des expériences de transfection transitoire dans des HEK 293T ainsi que des traitements pharmacologiques avec différents inhibiteurs spécifiques des kinases ATM ; DNAPKcs et Chk2. Grâce à ces expériences, nous avons démontré que l'augmentation de SUMOylation de la Lysine 314 de HIC1 était dépendante de la kinase ATM mais indépendante de Chk2 (Figure 64). Ce résultat peut avoir des conséquences fonctionnelles puisque, dans la littérature, il est surtout décrit que la kinase ATM une fois activée, agit principalement

au niveau de la chromatine alors que la kinase Chk2 une fois activée est localisée dans le nucléoplasme (Lukas et al. 2003; Polo et Jackson, 2011).

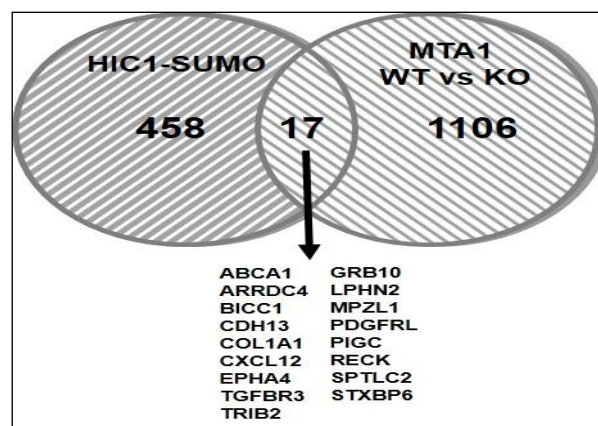


**Figure 64 :** Modifications post-traductionnelles de HIC1 en présence de dommages à l'ADN non-réparables. L'augmentation de SUMOylation de la Lysine 314 est strictement dépendante de la kinase ATM en réponse aux DSBs non réparables

Dans des conditions de dommages non réparables, l'augmentation de la SUMOylation de HIC1 favorise le recrutement de la protéine MTA1 (Figure 64) (Van Rechem et al., 2010) (Dehennaut et al. 2013) ce qui suggère que l'interaction entre HIC1 et le complexe NuRD joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose en présence de dommages à l'ADN. Au cours de l'apoptose, la cellule met en place un programme transcriptionnel particulier impliquant notamment le gène *TP53* qui active la transcription de gènes pro-apoptotiques. Il serait donc intéressant de déterminer quels sont les gènes cibles spécifiquement réprimés par l'interaction de la protéine HIC1 avec le complexe répresseur NuRD. Pour cela, l'équipe a réalisé des expériences d'ARN interférence en utilisant soit un siARN ciblant le gène *HIC1* soit un siCtrl dans les fibroblastes humains BJ-Htert pré-traités ou non avec 20µM d'Etoposide pendant 16h. L'évaluation des gènes cibles de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN non réparables a été effectuée par microarrays. Les premiers résultats obtenus par la comparaison des BJ-si contrôle avec les BJ-si HIC1 ont mis en évidence de nombreux gènes dont l'expression est augmentée dans les BJ-si HIC1 et qui seraient donc des

gènes-cibles directs ou indirects de HIC1. Parmi ceux-ci sont présents des gènes cibles directs de HIC1 déjà identifiés comme la désacétylase *SIRT1* (Chen et al., 2005) (Van Rechem et al. 2010) et la *Cycline D1* (Sébastien Pinte, résultats non publiés). L'analyse des résultats de ces expériences de microarrays nous a donc permis dans un premier temps de déterminer les gènes cibles réprimés par HIC1 (directement ou indirectement) et dans un deuxième temps ceux dont la répression dépend de l'interaction de HIC1 avec le complexe NuRD afin de caractériser les mécanismes mis en œuvre par la cellule et impliquant HIC1 lors de l'induction des dommages à l'ADN non réparables.

Pour aller plus loin dans cette analyse, nous avons également utilisé une étude de 2012 qui a identifié de nombreux gènes régulés spécifiquement par la protéine MTA1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (Ghanta et al., 2011). Cette étude a été réalisée en comparant des MEFs possédant la protéine MTA1 WT ou invalidée (MEFs MTA1/KO). Cette comparaison a identifié une liste de gènes spécifiquement réprimés par la protéine MTA1. La seule fonction connue de la SUMOylation de HIC1 est d'augmenter l'interaction entre HIC1 et MTA1. Nous avons donc croisé cette liste de gènes cibles de MTA1 avec la liste des 475 gènes spécifiquement réprimés par la protéine HIC1 « SUMOylée » (BJ-hTERT+siCtrl+Etop/BJ-hTERT+siHIC1+Etop) afin de sélectionner les gènes potentiellement co-régulés par les protéines HIC1 et MTA1 en réponse aux DSBs non réparables. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec le Dr Brian Rood, et a permis d'établir une autre liste de 17 gènes communs potentiellement co-régulés par les protéines HIC1 et MTA1 (Figure 65).

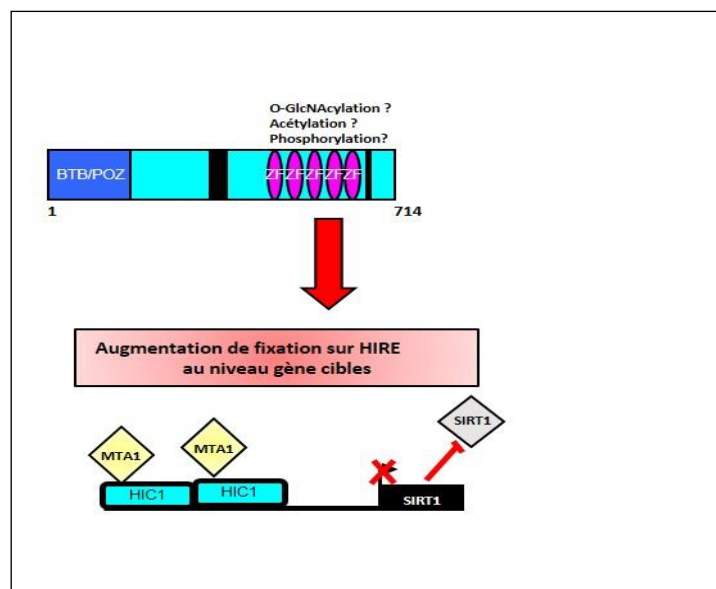


**Figure 65 :** Listes des gènes réprimés communs aux protéines HIC1 et MTA1



Nous sommes actuellement en train de valider ces gènes candidats en déterminant par des expériences de RT-qPCR leur expression dans les différentes conditions expérimentales utilisées.

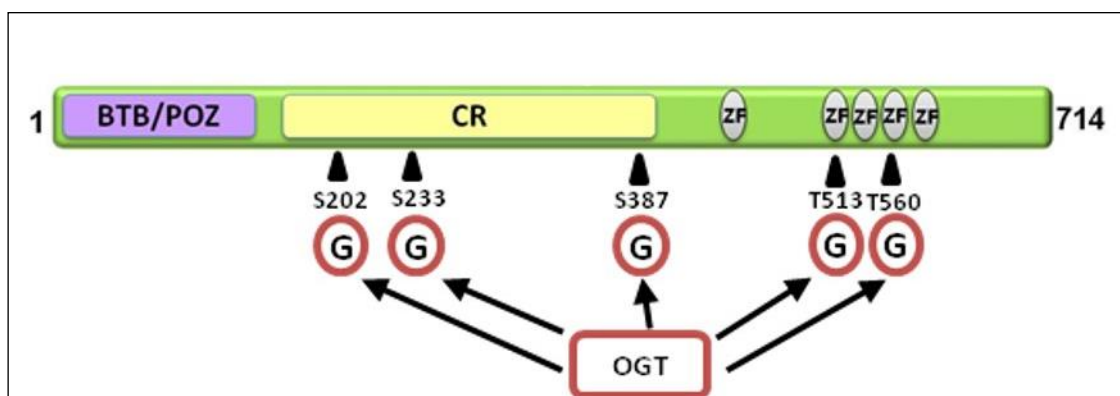
De plus, pour répondre aux commentaires des reviewers de notre manuscrit soumis à Oncotarget, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Ces expériences ont permis de montrer une augmentation de la fixation des co-répresseurs MTA1 et MTA3 sur le promoteur de *SIRT1* en réponse aux DSBs non réparables ce qui est en faveur de notre modèle liant le recrutement de MTA1 à une augmentation de la SUMOylation. De manière plus inattendue, nous avons également mis en évidence une augmentation du recrutement de la protéine HIC1 (Figure 66) (Figure 6 révisée de l'article HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair but is essential for the apoptotic DNA-damage response (DDR) to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs)).



**Figure 66 :** Rôle potentiel d'autres modifications post-traductionnelles (O-GlcNAcylation, Phosphorylation, Acétylation, ...) dans l'augmentation de fixation de la protéine HIC1 en réponse aux DSB non réparables au niveau du gène *SIRT1*

En ce qui concerne l'augmentation de fixation de la protéine HIC1 au niveau du promoteur de *SIRT1* en réponse aux DSBs non réparables, celle-ci pourrait impliquer l'augmentation de SUMOylation de la Lysine 314. Dans la littérature il a été décrit dans de nombreux exemples que cette MPT influe sur les interactions entre facteurs de transcription et corepresseurs. Cependant, dans deux exemples Oct4 et surtout PLZF

un répresseur de la famille BTB/POZ, la SUMOylation de la protéine a été impliquée dans l'augmentation de la liaison à l'ADN (Kang et al., 2003 ; Wei et al., 2007). Du point de vue de la structure primaire de la protéine, le site de SUMOylation est situé relativement loin des motifs en doigts de Zinc de la protéine HIC1 impliqués dans la fixation du motif HiRE. Au vu des modalités particulières de fixation à l'ADN des protéines à domaine BTB/POZ, on ne peut donc pas exclure un rôle de la SUMOylation qui favoriserait la dimérisation/multimérisation de HIC1. Cependant, cette hypothèse est peu probable puisque le seul SIM (SUMO-interacting Motif) identifié jusqu'ici est enfoui dans la structure du domaine BTB/POZ. De plus, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'autres MPTs au niveau de la région C-terminale de la protéine HIC1 qui pourraient être à l'origine de cette augmentation de fixation au niveau de l'ADN. En particulier, la O-GlcNAcylation pourrait être un bon candidat dans cette augmentation de fixation. D'une part, il a été montré que le domaine de fixation à l'ADN de HIC1 était O-GlcNAcylé même si cette modification n'a pas pu être directement impliquée dans la fixation à l'ADN *in vitro* (Lefebvre et al., 2004). Cependant, des études récentes utilisant le logiciel de prédiction O-GlcNAc-SCAN ont mis en évidence deux sites potentiels dans le domaine de liaison à l'ADN de HIC1 (Figure 67, Dehennaut et al., résultats non publiés).



**Figure 67 :** Sites de O-GlcNAcylation identifiés par le logiciel de prédiction « O-GlcNAcscan » (Lefebvre et al., 2004)( V. Dehennaut, résultats non publiés)

De plus, l'équipe a montré récemment que le niveau d'O-GlcNAcylation de la protéine HIC1 était augmenté en réponse aux dommages non réparables (V. Dehennaut, résultats non publiés). D'autre part, les données de la littérature confortent cette

hypothèse puisqu'il a été montré que la O-GlcNAcylation influe sur l'affinité de protéines au niveau de l'ADN telle que EZH2 (Chu et al., 2014) ou encore TET1 (Teneleven Translocation 1) (Shi et al., 2013).

L'acétylation de la région C-terminale pourrait également être un bon candidat. En effet, dans la littérature il a été décrit que la phosphorylation de la protéine p53 permettait l'acétylation de celle-ci en recrutant les protéines CBP/P300 favorisant ainsi sa fixation au niveau de l'ADN (Lambert et al., 1998). De même, une étude a montré que l'acétylation de la protéine E2F1 était importante pour sa fixation au niveau de l'ADN (Bauer et al., 2000) pour réprimer ses gènes cibles. Ainsi, il serait très intéressant de réaliser une autre étude de protéomique dans des conditions de dommages à l'ADN non réparables (Etoposide 16h) afin de déterminer si la protéine HIC1 est modifiée par ces différentes MPTs et après l'identification des sites pertinents de tester par la réalisation de mutants ponctuels leur implication dans la liaison à l'ADN.

Concernant les mécanismes qui permettent l'augmentation de la SUMOylation de la Lysine 314, plusieurs hypothèses sont envisageables. Premièrement, du fait de l'implication de la kinase ATM dans l'augmentation de la SUMOylation de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN non réparables, il se pourrait que celle-ci phosphoryle une autre kinase ne faisant pas partie de la famille PIKK. Celle-ci phosphorylerait à son tour HIC1 sur un autre site de phosphorylation par exemple. Ceci semble plausible puisque notre étude de protéomique a identifié un site de phosphorylation proche du motif MK<sup>314</sup>HEP au niveau de la région centrale de HIC1. Il s'agit de la Sérine 321 MKHEPGLGS<sup>321</sup>Y qui est phosphorylée à la fois en conditions contrôles (DMSO) et en cas d'induction de dommages à l'ADN réparables (Table 6). Cette phosphorylation de la Sérine 321 créerait donc une charge négative au voisinage du site de SUMOylation. HIC1 pourrait donc faire partie des protéines dont la SUMOylation est dépendante de la phosphorylation (Yang et Grégoire, 2006). De plus, le groupe d'A. Sharrocks a défini un motif de SUMOylation étendu,  $\psi$ KxExx(E/D)4xxx qu'ils ont appelé NDSM pour « Negatively charged amino acid-Dependent SUMOylation Motif » et qui est par exemple présent dans le facteur de transcription Elk1 (Yang et al., 2006). Ces charges négatives peuvent interagir avec un cluster de résidus basiques présent au voisinage du site actif de l'enzyme de conjugaison Ubc9 et ainsi favoriser la SUMOylation du substrat. Des résultats préliminaires obtenus avec un mutant ponctuel non phosphorylable S321A semblent indiquer que la phosphorylation de la Sérine 321

qui mime partiellement le motif NDSM est bien impliquée dans la SUMOylation de HIC1 en réponse aux dommages non réparables (Résultats non montrés). Dans ce cas, la recherche de la kinase impliquée dans ce phénomène et son éventuelle régulation par ATM semblent être une suite logique. Deuxièmement, nous pouvons supposer que la kinase ATM pourrait agir au niveau de la machinerie de la SUMOylation soit en activant une E3 ligase, soit en inhibant une déSUMOylase de la famille SENP. En effet, nous avons montré que le mutant 305-326 de HIC1 qui contient 21 acides aminés de la région centrale de HIC1 dont le motif MK<sup>314</sup>HEP nécessaire à la SUMOylation ainsi qu'un site potentiel de phosphorylation au niveau de la Sérine 321, était SUMOylé et que ce fragment est poly-SUMOylé en réponse aux dommages à l'ADN non réparables (Paget et al., résultats non montrés). Dans ce cas-ci, l'augmentation de la SUMOylation de la lysine 314 du motif MKHEP peut être induite par plusieurs mécanismes, soit par l'activation d'une enzyme de la machinerie de SUMOylation telle que l'enzyme de conjugaison ubc9, soit par l'inhibition d'une déSUMOylase de la famille SENP ou soit par la coopération de ces deux processus moléculaires. Tout d'abord, du fait de la courte séquence de la protéine mutée (21 acides aminés), seule la protéine de conjugaison ubc9 peut s'y fixer. De plus, une étude sur l'hypoxie a montré que lorsque l'enzyme de conjugaison ubc9 était acétylée, la SUMOylation de ses substrats au niveau d'un motif de SUMOylation de type NSDM ( $\psi$ -K-X-E/D) était fortement diminuée et qu'il existait une voie de régulation impliquant la désacétylase SIRT1 pour moduler la SUMOylation des protéines lors de la réponse à l'hypoxie (Hsieh et al., 2013). Ceci pourrait s'appliquer dans notre étude puisque le fragment 305-326 de la protéine HIC1 possède le même type de motif de SUMOylation. En effet, la kinase ATM pourrait donc permettre également l'activation de l'enzyme de conjugaison ubc9 qui dans notre cas serait désacétylée par SIRT1 afin d'amplifier le système permettant ainsi l'augmentation de la SUMOylation de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN.

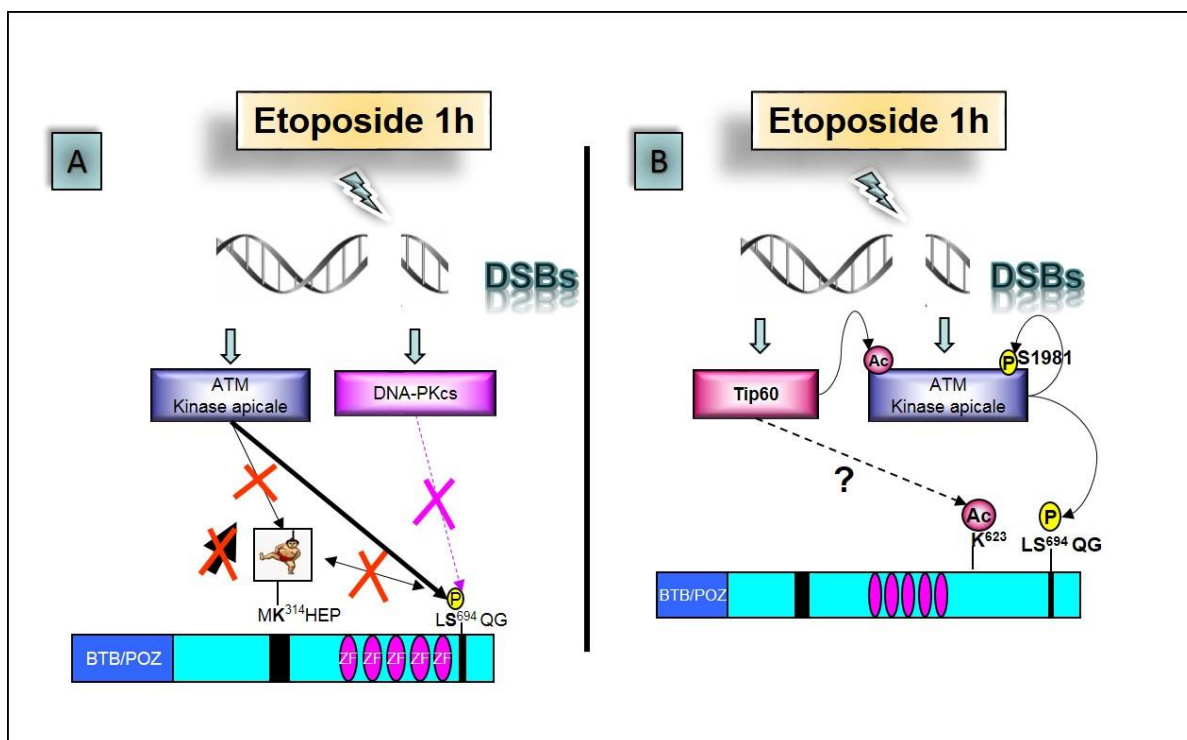
L'augmentation de la SUMOylation de HIC1 peut également s'expliquer par l'inhibition d'une déSUMOylase telle que SENP2. Cette hypothèse est très intéressante puisque la déSUMOylase SENP2 a été identifiée dans la liste des gènes cibles réprimés par HIC1 dans les fibroblastes BJ-hTERT. Il se pourrait également qu'il y ait une coopération entre les mécanismes décrits précédemment qui induirait une augmentation de la SUMOylation de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN.

## 2/ Les modifications post traductionnelles de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables

Grâce à une étude *in silico*, l'équipe a identifié dans la séquence peptidique de HIC1 un unique site potentiel de phosphorylation pour ces kinases dans l'extrémité C-terminale : **LS<sup>694</sup>QG**.

Pour confirmer ce résultat, une étude de protéomique réalisée en collaboration avec le Dr Adeline Page (IGBMC, Strasbourg) a été réalisée et a identifié spécifiquement en réponse aux DSBs réparables dans les HEK 293T transfectées par un vecteur d'expression FLAG-HIC1 plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Table 6) dont la Sérine 694 en C-terminal de HIC1 et un site d'acétylation sur la Lysine 623 qui est située au niveau d'un site consensus potentiel de Tip60, une acétyl-transférase impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. En ce qui concerne l'acétylation de la Lysine 623, l'équipe a montré que HIC1 interagissait avec l'acétyl transférase Tip60 (Van Rechem et al., résultats non publiés). Cependant, nos résultats concernant le rôle de cette MPT dans la réponse aux DSBs nous montrent que celle-ci ne serait pas très importante pour la réparation des cassures double brin comme nous le montre nos expériences d'essais comètes avec le mutant non acétylable HIC1K623R. Par contre, la comparaison des différentes séquences peptidiques entre les mammifères et les oiseaux nous montre que la Lysine 623 est un acide aminé parfaitement bien conservé depuis les mammifères jusqu'aux reptiles, au même titre que le motif GLDLSKK impliqué dans l'interaction avec CtBP (Deltour et al., 2002) ou que le motif de SUMOylation. Ceci suggère fortement que la Lysine 623 pourrait avoir un rôle très important en réponse aux dommages à l'ADN mais pas dans la réparation des cassures double brin mais peut être dans l'interaction avec un partenaire impliqué dans la répression transcriptionnelle (Figure 68B).

Ensuite, en ce qui concerne la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1, nous avons montré par transfection transitoire, en utilisant soit des inhibiteurs pharmacologiques ou soit des siRNAs ciblant spécifiquement les kinases ATM ou DNA-PKcs, que la protéine HIC1 était phosphorylée en réponse aux dommages à l'ADN réparables par la kinase ATM (Figure 68A). De plus, nous avons montré que la phosphorylation de la Sérine 694 n'a aucun impact sur la SUMOylation de la Lysine 314.



**Figure 68 :** Modifications post-traductionnelles de HIC1 en réponse aux DSBs réparables. A/ la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 est strictement dépendante de la kinase ATM en réponse aux DSBs réparables et n’influe pas sur le niveau de la SUMOylation ; B/ la protéine HIC1 est acétylée en réponse aux DSBs par l’acétyl transférase Tip60

Ensuite, nous avons montré que la phosphorylation de la Sérine 694 est importante pour la contribution de la protéine HIC1 dans la réparation des DSBs comme le montre nos expériences d’essais comètes avec le mutant non phosphorylable HIC1S694A. Etant donné que la phosphorylation induite par la protéine kinase ATM au niveau de ces substrats est essentiellement impliquée dans le recrutement de protéine de réparation et dans la signalisation de la réparation des DSBs par recombinaison homologue ou par NHEJ, nous nous sommes demandés si la protéine HIC1 pouvait avoir un rôle dans ces différents mécanismes. Ainsi, afin d’élucider la signalisation par laquelle les modifications post-traductionnelles de la protéine HIC1 permettent la réparation des cassures double brin et notamment la phosphorylation de la Sérine 694, nous avons collaboré avec le Dr Josée Guirouilh-Barbat. Par des expériences *in vitro* permettant de déterminer l’implication de la recombinaison homologue ou de la NHEJ

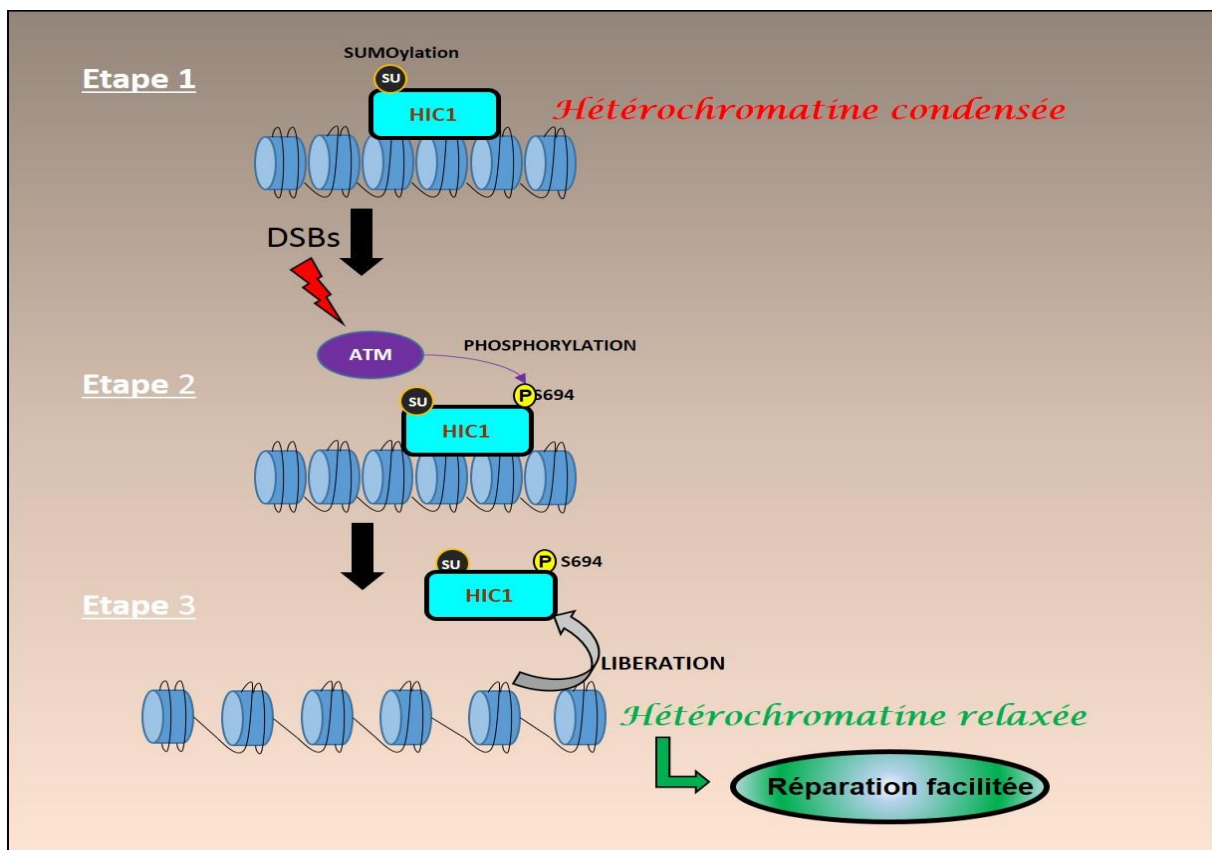
au cours de la réparation des dommages à l'ADN, l'équipe de Josée Guirouilh-Barbat a conclu sur l'absence d'effet de la surexpression de la protéine HIC1 WT ou HIC1S694A sur l'efficacité de la réparation dans ces deux mécanismes. Cependant, par des expériences de fractionnement cellulaire dans les cellules myo-fibroblastiques, les WPMY-1, nous avons montré que la phosphorylation de la protéine HIC1 permet le « décrochage » de la protéine HIC1 de la chromatine pour aller se localiser au niveau du nucléoplasme.

Ainsi, concernant le rôle de la phosphorylation de la Sérine 694 induite par la kinase ATM en réponse aux dommages à l'ADN, plusieurs hypothèses sont alors envisageables. Tout d'abord, l'invalidation de HIC1 par siRNAs dans les fibroblastes induit une persistance des foyers  $\gamma$ H2AX et une réparation plus lente des dommages à l'ADN par rapport à des fibroblastes humains exprimant la protéine HIC1 (Dehennaut et al., 2013). Cependant, nous avons montré que la phosphorylation de la Sérine 694 est importante pour la contribution de HIC1 dans la réparation des DSBs en permettant le « décrochage » de HIC1 de la chromatine. Nous pouvons donc penser que HIC1 jouerait un rôle différent dans la réponse aux dommages à l'ADN en fonction de la localisation des DSBs puisque la réparation des dommages à l'ADN s'effectue par des mécanismes différents selon leur localisation nucléaire. En effet, les dommages à l'ADN peuvent se localiser au niveau de l'hétérochromatine dont le niveau de compaction de la chromatine est élevé rendant l'accès aux protéines de réparation difficilement accessible impliquant une étape intermédiaire de relaxation de la chromatine pour permettre la réparation des DSBs, mais également au niveau de l'euchromatine dont le niveau de compaction de la chromatine est relâché facilitant ainsi l'accès aux protéines de réparation.

### 2.1/ Rôle de la phosphorylation de la Sérine 694 de HIC1 en présence de DSBs au niveau de l'hétérochromatine

Comme décrit précédemment, nos résultats montrent que la phosphorylation de la Sérine 694 est importante pour la contribution de HIC1 dans la réparation des DSBs et nous avons montré que la phosphorylation de la Sérine 694 induite par ATM permettait le « décrochage » de HIC1 de la chromatine. De plus, l'équipe a montré que des séquences de fixation de HIC1 HIRE étaient retrouvées au niveau d'une sous

famille de séquences répétitives Alu présentes à plus de 200 000 copies dans le génome (S Pinte, Thèse de Doctorat, 2004). Ces séquences répétées sont situées au niveau de l'hétérochromatine. Cependant, elles se retrouvent également dans l'euchromatine au niveau de nombreux gènes notamment au niveau du gène *SNAP43* humain qui était le gène le plus réprimé suite à la ré-introduction de HIC1 dans des cellules U2OS grâce à un vecteur de type Adénovirus (Pinte et al., 2004). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la phosphorylation de la Sérine 694 de la protéine HIC1 permettrait le décrochage de la protéine HIC1 afin de faciliter la relaxation de la chromatine pour permettre la réparation des DSBs situés au niveau de l'hétérochromatine (Figure 69) comme c'est le cas pour la protéine KAP1.



**Figure 69 :** La phosphorylation de la Sérine 694 permettrait le décrochage de la protéine HIC1 pour induire la relaxation de la chromatine afin de faciliter la réparation des DSBs au niveau de l'hétérochromatine

En effet, les données de la littérature montrent qu'en réponse aux dommages à l'ADN la protéine KAP1 est phosphorylée par la kinase ATM induisant son « décrochage » de l'hétérochromatine par un mécanisme de relaxation de la chromatine pour aller se localiser au niveau du nucléoplasme permettant ainsi un accès facilité aux protéines



de réparation. La protéine KAP1 est un corépresseur obligatoire pour la famille de répresseurs transcriptionnels KRAB-ZNF qui compte plus de 400 membres et qui associe des doigts de Zinc avec un domaine KRAB interagissant avec KAP1 (Huntley et al., 2006 ; Santoni de Sio, 2014). On aurait donc comme mécanismes potentiels pour relaxer l'hétérochromatine soit la phosphorylation par ATM d'un corépresseur unique, KAP1, interagissant avec plus de 400 facteurs de transcription différents et donc fixés à de nombreux sites dans le génome soit la phosphorylation par ATM d'un unique facteur de transcription, HIC1, potentiellement fixé à plus de 200 000 séquences répétées de type Alu.

Pour répondre à cette hypothèse, des expériences d'immunofluorescence en cellules Cos 7 devront être réalisées afin de déterminer une potentielle co-localisation entre la protéine HIC1 et la marque H3K9me3, spécifique de l'hétérochromatine. De plus, une comparaison entre cette éventuelle co-localisation dans des conditions normales en absence de dommages à l'ADN et dans des conditions en présence de DSBs permettra de mieux comprendre ce mécanisme. Des expériences de ChIP ciblés sur des séquences Alu dans l'hétérochromatine situées au niveau du gène *SNAP43* peuvent également être réalisés.

Mais surtout, on pourrait envisager de expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-Seq) suivies de séquençage pour HIC1 dans les conditions contrôles (DMSO), Etoposide 1h et Etoposide 16h afin d'avoir une vision globale de la fixation de HIC1 au niveau pan-génomique dans ces trois situations.

## 2.2/ Rôle de la protéine HIC1 dans la réparation de DSBs au niveau de l'euchromatine

Au niveau de l'euchromatine, la phosphorylation de la protéine HIC1 pourrait lui permettre de recruter des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN comme dans le cas de la protéine Sp1 (Specificity protein 1). En effet, une étude a montré que Sp1 était recrutée au niveau des cassures double brin pour faciliter la réparation des dommages par un mécanisme non transcriptionnel (Beishline et al., 2012). De plus, ce facteur de transcription Sp1 est également une cible directe de la kinase ATM. Nous savons également que HIC1 interagit avec d'autres répresseurs transcriptionnels, notamment avec une protéine de la famille Polycomb nommée PHF1 (PHD Finger Protein 1) pour réprimer ses gènes cibles (Boulay et al., 2012). En effet,

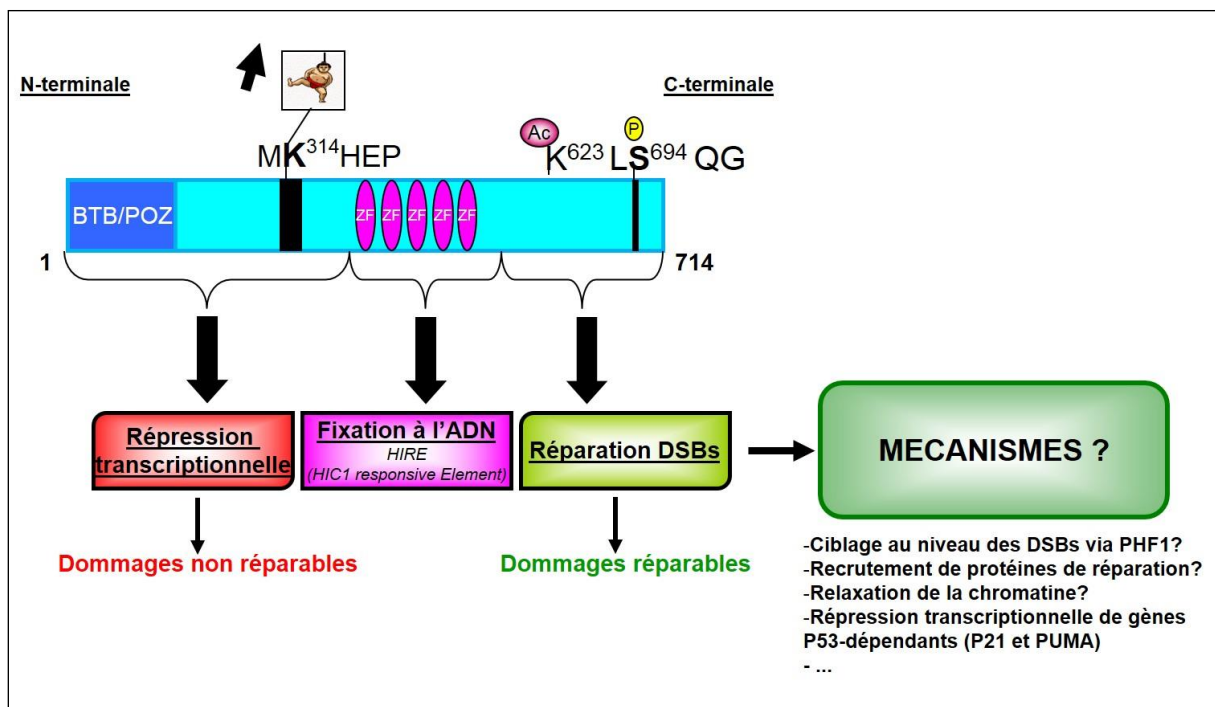
l'interaction HIC1/PHF1 induit la répression du gène ATOH1 qui code un facteur de transcription pro-neural essentiel à la croissance des cellules neuronales (Briggs et al., 2008). De plus, dans la littérature il est décrit que la protéine PHF1 joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN puisque celle-ci est recrutée de façon transitoire et rapide au niveau des cassures double brin (Hong et al., 2008). Il serait donc intéressant de regarder si la protéine HIC1 interagit et est colocalisée avec la protéine PHF1 aux sites de DSBs. Ensuite, nos résultats récents concernant l'implication transcriptionnelle de la protéine HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN réparables dans les myo-fibroblastiques WPMY-1 sont très intéressants puisqu'ils nous indiquent que la protéine HIC1 réprime différents gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose tels que *P21* ou encore *BBC3/PUMA*. Ces deux derniers gènes sont directement régulés par la protéine p53 en réponse aux DSBs pour bloquer le cycle cellulaire et induire l'apoptose. De plus l'inhibition de HIC1 par ARN interférence dé-réprime l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN tels que *FEN1*, *BARD1* et *ERCC1*.

HIC1 pourrait donc avoir un double effet dans la réparation des cassures double brin au niveau de l'euchromatine. Premièrement, HIC1 pourrait jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN de façon non transcriptionnelle par sa capacité à interagir avec d'autre protéine tel que la protéine PHF1 ou via son interaction avec des protéines de réparation par exemple, même si les tests fonctionnels réalisés avec des vecteurs permettant de suivre la réparation par NHEJ et HR ne sont pas en faveur de cette hypothèse. Deuxièmement, et plus probablement sa fonction de répresseur transcriptionnel lui permettrait de réprimer ces gènes cibles tels que *P21* et *PUMA* pour contrecarrer les effets de la protéine p53.

En conclusion, nos résultats nous permettent d'attribuer une fonction à l'extrémité C-terminale de HIC1 (Figure 70). En effet, l'extrémité C-terminale de HIC1 présente un pourcentage de conservation phylogénétique assez important ( $\approx 70\%$ ) dans les différentes protéines HIC1 mais aucune fonction n'avait pu lui être clairement attribuée jusqu'à présent.

Nos résultats suggèrent que cette région jouerait un rôle important dans la réparation des DSBs suite à l'induction de modifications post-traductionnelles. D'une part la phosphorylation de la Sérine 694 et d'autre part l'acétylation de la Lysine 623 sont importantes pour la contribution de HIC1 dans la réparation puisque les protéines

mutées non phosphorylable HIC1S694A et non acétylable HIC1K623R réparent beaucoup moins rapidement les dommages perçus lors de l'induction de DSBs. Cependant, l'acétylation de la Lysine 623 jouerait tout de même un rôle moins important que la phosphorylation de la Sérine 694 dans la réparation mais pourrait avoir d'autres fonctions.



**Figure 70 :** Représentation schématique des différentes fonctions de la protéine HIC1 en fonction de ces différents domaines

De manière générale, mon travail de thèse a permis de démontrer une régulation fine des modifications post-traductionnelles de HIC1 en réponse aux dommages à l'ADN. HIC1 joue donc un rôle différent dans la réponse aux cassures double-brin de l'ADN en fonction de leur intensité via ses différentes MPTs. En effet, en réponse aux dommages à l'ADN non réparables, l'augmentation de la SUMOylation de la Lysine 314 favoriserait sa fonction de répresseur transcriptionnel via MTA1 et le complexe NuRD en lui permettant de réprimer ces gènes cibles tel que la désacétylase SIRT1 afin de stabiliser la protéine p53 pour induire l'apoptose. Par contre, en réponse aux dommages à l'ADN deux mécanismes sont envisageables. Premièrement la phosphorylation de la Sérine 694 permettrait le décrochage de HIC1 au niveau de l'hétérochromatine pour permettre la relaxation de la chromatine et faciliter le recrutement des protéines de réparation et deuxièmement, la protéine HIC1 jouerait,

en présence de DSBs réparables au niveau de l'euchromatine, son rôle de répresseur transcriptionnel classique, [mais indépendamment de MTA1/NuRD puisque la SUMOylation n'est pas requise] pour contrecarrer l'effet de la protéine p53 et permettre la reprise du cycle cellulaire dès que la réparation des dommages a été effectuée.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Acs, K. et al., 2011. The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(12), pp.1345–1350.
- Ajimura, M., Leem, S.H. & Ogawa, H., 1993. Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 133(1), pp.51–66.
- Albagi, O. et al., 1995. The BTB/POZ Domain: A New Protein-Protein Motif Common to DNA- and Actin-binding Interaction Proteins. *Cell Growth & Differentiation*, 6, pp.1193–1198.
- Allen, C., Halbrook, J. & Nickoloff, J.A., 2003. Interactive Competition Between Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining 1 1 NIH grant CA77693 to J . A . N . Interactive Competition Between Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining. *molecular cancer research*, 1, pp.913–920.
- Amélie Fradet-Turcotte et al., 2013. 53BP1 is a reader of the DNA damage-induced H2A Lys15 ubiquitin mark. *Nature*, 499(7456), pp.50–54.
- Anckar, J. et al., 2006. Inhibition of DNA Binding by Differential Sumoylation of Heat Shock Factors Inhibition of DNA Binding by Differential Sumoylation of Heat Shock Factors. *Molecular and cellular biology*, 26(3), pp.955–964.
- Aprelikova, O., Xiong, Y. & Liu, E.T., 1995. Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), pp.18195–18197.
- Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D. & Venkitaraman, A.R., 2009. Mobilization and recruitment of HP1: a bimodal response to DNA breakage. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(18), pp.2945–2950.
- Bachmann, I.M. et al., 2006. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *Journal of Clinical Oncology*, 24(2), pp.268–273.
- Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), pp.499–506.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), pp.421–429.
- Bartek, J. & Lukas, J., 2001. Pathways governing G1 / S transition and their response to DNA damage. *FEBS Letters* 490, 490, pp.117–122.
- Batey, M.A. et al., 2013. Preclinical evaluation of a novel ATM inhibitor , KU59403 , in vitro and in vivo in p53 functional and dysfunctional models of human cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 12(6), pp.959–967.
- Bauer, U. et al., 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO Journal*, 19(4), pp.662–671.
- Baumann, P., Benson, F.E. & West, S.C., 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-

- dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87(4), pp.757–766.
- Beà, S. et al., 2013. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), pp.18250–5.
- Beishline, K. et al., 2012. Sp1 facilitates DNA double-strand break repair through a nontranscriptional mechanism. *Molecular and cellular biology*, 32(18), pp.3790–9.
- Bergink, S. et al., 2006. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes and Development*, 20(10), pp.1343–1352.
- Beskow, C. et al., 2009. Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. *British journal of cancer*, 101(5), pp.816–821.
- Biddlestone-Thorpe, L. et al., 2013. ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation. *Clinical Cancer Research*, 19(12), pp.3189–3200.
- Block, W.D. et al., 2004. Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Research*.
- Bode, A.M. & Dong, Z., 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, 4(10), pp.793–805.
- Botuyan, maria victoria et al., 2006. Structural Basis for the Methylation State-Specific Recognition of Histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA Repair. *Cell*, 127(7), pp.1361–1373.
- Boulay, G. et al., 2012. 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. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), pp.5379–5389.
- Briggs, K.J., Eberhart, C.G. & Watkins, D.N., 2008. Just say no to ATOH: How HIC1 methylation might predispose medulloblastoma to lineage addiction. *Cancer Research*, 68(21), pp.8654–8656.
- Briones, V.R. et al., 2006. Mechanism of fibroblast growth factor-binding protein 1 repression by TGF-beta. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(2), pp.595–601.
- Britschgi, C. et al., 2006. Identification of the p53 family-responsive element in the promoter region of the tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1. *Oncogene*, 25(14), pp.2030–9.
- Bryans, M., Valenzano, M.C. & Stamato, T.D., 1999. Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: Evidence for stabilization by XRCC4. *Mutation Research - DNA Repair*.
- Buscemi, G. et al., 2001. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), pp.5214–5222.

- Calsou, P. et al., 2003. Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *Journal of Molecular Biology*.
- Campos, E.I. & Reinberg, D., 2009. Histones: annotating chromatin. *Annual review of genetics*, 43(1), pp.559–99.
- Cann, K.L. & Dellaire, G., 2011. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(1), pp.45–60.
- Carney, J.P. et al., 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 93(3), pp.477–486.
- Carter, T.H., Kopman, C.R. & James, C.B.L., 1988. DNA-stimulated protein phosphorylation in HeLa whole cell and nuclear extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Chai, B. et al., 2005. Distinct roles for the RSC and Swi / Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes & development*, 19, pp.1656–1661.
- Chan, D.W. & Lees-Miller, S.P., 1996. The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *Journal of Biological Chemistry*.
- Chan, K. et al., 2013. The histone H3 . 3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes and Development*, 27, pp.985–990.
- Chang, C.-J.C.-W.C.-J.C.-W. et al., 2008. Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC molecular biology*, 9, p.61.
- Chapman, J.R. & Jackson, S.P., 2008. scientific report complex at sites of DNA damage. *EMBO reports*, 9(8), pp.795–801.
- Chen et al., 2005. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*, 123(3), pp.437–448.
- Chen, B.P.C. et al., 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9), pp.6582–6587.
- Chen, B.P.C. et al., 2005. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), pp.14709–14715.
- Chen, J. & Stubbe, J., 2005. BLEOMYCINS: TOWARDS BETTER THERAPEUTICS. *Nature*, 5, pp.102–112.
- Chen, J.J. et al., 1999. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Research*, 59(7 SUPPL.), pp.1752–1756.
- Chen, L. et al., 2005. Effect of amino acid substitutions in the rad50 ATP binding domain on DNA double strand break repair in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 280(4), pp.2620–7.



- Chen, L. et al., 2001. Promotion of Dnl4-Catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Molecular Cell*, 8(5), pp.1105–1115.
- Chen, W. et al., 2004. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell*, 6(4), pp.387–398.
- Chen, W.Y. et al., 2003. Heterozygous disruption of Hic1 predisposes mice to a gender-dependent spectrum of malignant tumors. *Nature genetics*, 33(2), pp.197–202.
- Cheng, Z. et al., 2008. Functional characterization of TIP60 sumoylation in UV-irradiated DNA damage response. *Oncogene*, 27(7), pp.931–41.
- Cheung, W.L. et al., 2005. Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, 15(7), pp.656–660.
- Chipuk, J. et al., 2004. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Science*, 303(February), pp.1010–1015.
- Chiruvella, K.K., Liang, Z. & Wilson, T.E., 2013. Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Chu, C.-S.C.-S. et al., 2014. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), pp.1355–1360.
- Cornelis, R.S. et al., 1994. Evidence for a gene on 17p13.3, distal to TP53, as a target for allele loss in breast tumors without p53 mutations. *Cancer Research*, 54(15), pp.4200–4206.
- Crawford, T.O., 1998. Ataxia telangiectasia. *Seminars in Pediatric Neurology*, 5(4), pp.287–294.
- Cui, X. et al., 2005. Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 25(24), pp.10842–10852.
- Dehennaut, V. et al., 2013. DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (hic1) by sumoylation to regulate DNA repair. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), pp.10254–10264.
- Dehennaut, V. et al., 2013. Identification of p21 (CIP1/WAF1) as a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), pp.49–53. A
- Deltour, S. et al., 2001. Characterization of HRG22, a human homologue of the putative tumor suppressor gene HIC1. *Biochemical and biophysical research communications*, 287(2), pp.427–34.
- Deltour, S. et al., 2002. The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLKK motif. *Molecular and cellular biology*, 22(13), pp.4890–901.
- Deltour, S., Guerardel, C. & Leprince, D., 1999. Recruitment of SMRT<sup>-</sup>N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB<sup>-</sup>POZ

- transcriptional repressors : The case of HIC-1 and  $\square$  FBP-B. *PNAS*, 96(26), pp.2–7.
- Desai-mehta, A., Cerosaletti, K.M. & Concannon, P., 2001. Distinct Functional Domains of Nibrin Mediate Mre11 Binding , Focus Formation , and Nuclear Localization Distinct Functional Domains of Nibrin Mediate Mre11 Binding , Focus Formation , and Nuclear Localization. *Molecular and Cellular Biology*, 21(6), pp.2184–2191.
- Dinant, C. & Luijsterburg, M.S., 2009. The emerging role of HP1 in the DNA damage response. *Mol Cell Biol*, 29(24), pp.6335–6340.
- Ding, Q. et al., 2003. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), pp.5836–5848.
- Doil, C. et al., 2009. RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell*, 136(3), pp.435–446.
- Donzelli, M. & Draetta, G.F., 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*, 4(7), pp.671–7.
- Dou, H. et al., 2010. Regulation of DNA Repair through DeSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex. *Molecular Cell*, 39(3), pp.333–345. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.021>.
- Douglas, P. et al., 2007. The DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Is Phosphorylated In Vivo on Threonine 3950, a Highly Conserved Amino Acid in the Protein Kinase Domain. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 27(5), pp.1581–1591.
- Downs, J. a, Lowndes, N.F. & Jackson, S.P., 2000. A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408(6815), pp.1001–1004.
- Du, L. et al., 2010. Radiosensitization and growth inhibition of cancer cells mediated by an scFv antibody gene against DNA-PKcs in vitro and in vivo. *Radiat Oncol*, 5, p.70.
- Dubuissez, M. et al., 2013. The Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are direct target genes of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440(3), pp.424–430.
- Dupré, A. et al., 2008. A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11–Rad50–Nbs1 complex. *Nat. Chem Biol*, 4(2), pp.119–125.
- Eguchi, K. et al., 1997. DNA hypermethylation at the D17S5 locus in non-small cell lung cancers: Its association with smoking history. *Cancer Research*, 57(21), pp.4913–4915.
- Elliott, S.L. et al., 2011. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: A potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 152(1), pp.61–71.

- Enserink, J.M., 2010. Cell Cycle Regulation of DNA Replication in *S. cerevisiae*. *DNA Replication-Current Advances*, 1, pp.391–408.
- Escribano-Díaz, C. et al., 2013. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 49(5), pp.872–883.
- Falck, J. et al., 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410(6830), pp.842–847.
- Falck, J., Coates, J. & Jackson, S.P., 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434, pp.605–611.
- Fell, V.L. & Schild-Poulter, C., 2015. The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 763, pp.15–29.
- Forget, K., 2012. Single-Molecule Imaging of DNA Pairing by RecA Reveals a 3-Dimensional Homology Search. *Nature*, 482(7385), pp.1–15.
- Forster, E. et al., 2010. Emerging Topics in Reelin Function. *Eur J Neurosci.*, 31(9), pp.1511–1518.
- Foster, S.A. et al., 1998. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Molecular and cellular biology*, 18(4), pp.1793–801.
- Foveau, B. et al., 2012. The receptor tyrosine kinase EphA2 is a direct target gene of hypermethylated in cancer 1 (HIC1). *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), pp.5366–5378.
- Freed-pastor, W. a & Prives, C., 2012. Mutant p53 : one name , many proteins. *Genes and Development*, 26, pp.1268–1286.
- Frit, P. et al., 2014. Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair*, 17, pp.81–97.
- Fu, Y., Yu, J. & Cheng, T., 2003. Breast Cancer Risk Associated with Genotypic Polymorphism of the Nonhomologous End-Joining Genes : A Multigenic Study on Cancer Susceptibility Breast Cancer Risk Associated with Genotypic Polymorphism of the Nonhomologous End-Joining Genes : A Multigenic. *Cancer Research*, 63, pp.2440–2446.
- Fujii, H. et al., 1998. Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer. *Oncogene*, 16, pp.2159–2164.
- Furuse, M. et al., 1998. Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO Journal*, 17(21), pp.6412–6425.
- Galanty, Y. et al., 2009. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*, 462(7275), pp.935–9.
- Game, J.C. & Mortimer, R.K., 1974. A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 24(3), pp.281–292.
- Garvin, A.J. et al., 2013. The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair. *EMBO reports*, 14(11), pp.975–83.

- Gatei, M. et al., 2011. ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein Regulates DNA repair and cell cycle control. *Journal of Biological Chemistry*, 286(36), pp.31542–31556.
- Ghanta, K.S. et al., 2011. Gene profiling of Mta1 identifies novel gene targets and functions. *PLoS ONE*, 6(2), pp.1–18.
- Gong, F. et al., 2015. Screen identifies bromodomain protein ZMYND8 in chromatin recognition of transcription-associated DNA damage that promotes homologous recombination. *Genes and Development*, 29(2), pp.197–211.
- Goodarzi, A.A. et al., 2008. ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Molecular Cell*, 31(2), pp.167–177.
- Goodarzi, A.A. & Jeggo, P.A., 2012. The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: How to get the entry visa. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), pp.11844–11860.
- Goodarzi, A.A., Kurka, T. & Jeggo, P.A., 2011. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat Struct Mol Biol*, 18(7), pp.831–839.
- Gospodinov, a. et al., 2011. Mammalian Ino80 Mediates Double-Strand Break Repair through Its Role in DNA End Strand Resection. *Molecular and Cellular Biology*, 31(23), pp.4735–4745.
- Gostissa, M. et al., 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO Journal*, 18(22), pp.6462–6471.
- Grawunder, U., Zimmer, D. & Lieber, M.R., 1998. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Current Biology*, 8, pp.873–876.
- Gu, Y. et al., 1997. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Immunology*, 94, pp.8076–8081.
- Guardavaccaro, D. & Pagano, M., 2006. Stabilizers and Destabilizers Controlling Cell Cycle Oscillators. *Molecular Cell*, 22(1), pp.1–4.
- Guerardel, C. et al., 2001. Identification in the Human Candidate Tumor Suppressor Gene HIC-1 of a New Major Alternative TATA-less Promoter Positively Regulated by p53. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), pp.3078–3089.
- Gursoy-Yuzugullu, O., Ayrapetov, M.K. & Price, B.D., 2015. Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), pp.7507–12.
- Gursoy-Yuzugullu, O., House, N. & Price, B.D., 2015. Patching Broken DNA: Nucleosome Dynamics and the Repair of DNA Breaks. *Journal of Molecular Biology*, 428(9), pp.1846–1860.
- Haber, J.E., 1998. The many interfaces of Mre11. *Cell*, 95(5), pp.583–586.

- Hadley, K.O. et al., 1995. DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit: A Relative of Phosphatidylinositol 3-Kinase and the Ataxia Telangiectasia Gene Product. *Cell*, 82, pp.849–856.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G. & Bartek, J., 2008. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science*, 319(March), pp.1352–1356.
- Hammerman, P.S. et al., 2012. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), pp.519–525.
- Hang, L.E. et al., 2014. Regulation of Ku-DNA association by yku70 C-terminal tail and SUMO modification. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), pp.10308–10317.
- Hannay, J. a F. et al., 2007. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Molecular cancer therapeutics*, 6(5), pp.1650–1660.
- Hay, R.T., 2005. SUMO: A history of modification. *Molecular Cell*, 18(1), pp.1–12.
- Hernan JG. et al., 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation . *New England journal of Medicine*. 349 (21): 2042-54
- Hickson, I. et al., 2004. Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM. *Cancer Research*, 64(24), pp.9152–9159.
- Hill, R. & Lee, P.W.K., 2010. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle*, 9(17), pp.3460–3469.
- Hofmann, K. & Bucher, P., 1995. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(9), pp.347–349.
- Hofmann, T.G. et al., 2002. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nature cell biology*, 4(January 2002), pp.1–10.
- Hong, Z. et al., 2008. A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Research*, 36(9), pp.2939–2947.
- Hopfner, K.P. et al., 2001. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell*, 105(4), pp.473–485.
- Hsieh, Y.L. et al., 2013. Ubc9 acetylation modulates distinct SUMO target modification and hypoxia response. *Embo J*, 32(6), pp.791–804.
- Hsu, F.-M., Zhang, S. & Chen, B.P., 2012. Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment. *Transl Cancer Res*, 1(1), pp.22–34.
- Huntley, S. et al., 2006. A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes: Insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors A comprehensive catalog of human KRAB-associated zinc finger genes : Insights into the evolutionary. *Genome Research*, pp.669–677.

- Ichijima, Y. et al., 2005. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), pp.807–812.
- Issa, J.P.J. et al., 1997. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Research*, 57(9), pp.1678–1681.
- Ivanov, A. V. et al., 2007. PHD Domain-Mediated E3 Ligase Activity Directs Intramolecular Sumoylation of an Adjacent Bromodomain which is Required for Gene Silencing. *Molecular Cell*, 28(5), pp.823–837.
- Iyer, N.G., & Zdzienicka, H. & Caldas, C., 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene*, 23(24), pp.4225–4231.
- Jackson, S.P. et al., 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*.
- De Jager, M. et al., 2001. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell*.
- Janeckova, L. et al., 2015. HIC1 Tumor Suppressor Loss Potentiates TLR2/NF- $\kappa$ B Signaling and Promotes Tissue Damage-associated Tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 13(7), pp.1139–48.
- Jeggo, P.A. & Downs, J.A., 2014. Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. *Experimental Cell Research*, 329(1), pp.69–77.
- Jenal, M. et al., 2010. Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor--not just a question of promoter hypermethylation? *Swiss medical weekly: official journal of the Swiss Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology*, 140(November), pp.1–7.
- Jenal, M. et al., 2009. The tumor suppressor gene hypermethylated in cancer 1 is transcriptionally regulated by E2F1. *Mol Cancer Res*, 7(6), pp.916–22.
- Jette, N. & Lees-Miller, S.P., 2015. The DNA-dependent protein kinase: a multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Prog Biophys Mol Biol.*, 117(0), pp.1–29.
- Jiang, M., Chiu, S.-Y. & Hsu, W., 2011. SUMO-specific protease 2 in Mdm2-mediated regulation of p53. *Cell death and differentiation*, 18(6), pp.1005–1015.
- Jin, J. et al., 2003. SCF<sup>TRCP</sup> links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes and Development*, 17(24), pp.3062–3074.
- Johnson, E.S. et al., 1997. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO Journal*, 16(18), pp.5509–5519.
- Kanai, Y. et al., 1999. DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 29(3), pp.703–709.
- Kang, S.I. et al., 2003. Modification of Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein (PLZF) by SUMO-1 Conjugation Regulates its Transcriptional Repressor Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), pp.51479–51483.

- Keeney, S., Lange, J. & Mohibullah, N., 2014. Self-Organization of Meiotic Recombination Initiation: General Principles and Molecular Pathways. *Annual review of genetics*, 48, pp.1–33.
- Khalifa, J., Boyrie, S. & Moyal, É., 2012. Réparation des lésions de l'ADN radio-induites et radiosensibilité Repair of radiation-induced DNA damage and radiosensitivity. *Correspondances en Onco-Théranostic*, 1(4), pp.153–159.
- Khan, S.N. et al., 2013. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia*, 27(6), pp.1301–9.
- Kijas, A.W. et al., 2015. ATM-dependent phosphorylation of MRE11 controls extent of resection during homology directed repair by signalling through Exonuclease 1. *Nucleic Acids Research*, 43(17), pp.8352–8367.
- Kleer, C.G. et al., 2003. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), pp.11606–11.
- Kobayashi, J. et al., 2002. NBS1 Localizes to gammaH2AX Foci through Interaction with the FHA / BRCT Domain. *Current Biology*, 12(2), pp.1846–1851.
- Koboldt, D.C. et al., 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), pp.61–70.
- Van Der Kolk, D.M. et al., 2010. Penetrance of breast cancer, ovarian cancer and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 families: High cancer incidence at older age. *Breast Cancer Research and Treatment*, 124(3), pp.643–651.
- Komatsu, K., 2016. NBS1 and multiple regulations of DNA damage response. *Journal of Radiation Research*, p.rw031.
- Komuro, Y. et al., 2002. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer*, 95(6), pp.1199–1205.
- Kornberg MD. 1974. Chromatin structure : a repeating unit of histones and DNA. *Sciences*, 184(4139): 868-71
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Kozlov, S. et al., 2003. ATP activates Ataxia-telangiectasia Mutated (ATM) in vitro: Importance of autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp.9309–9317.
- Kozlov, S. V et al., 2006. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO journal*, 25(15), pp.3504–3514.
- Kozlov, S. V. et al., 2011. Autophosphorylation and ATM activation: Additional sites add to the complexity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp.9107–9119.
- Lambert, P.F. et al., 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), pp.33048–33053.
- Lan, L. et al., 2010. The ACF1 Complex Is Required for DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells. *Molecular Cell*, 40(6), pp.976–987.

- Lavin, M. et al., 2015. ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules*, 5(4), pp.2877–2902.
- Lee, H.-S. et al., 2010. A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *The EMBO journal*, 29(8), pp.1434–1445.
- Lee, J.H. et al., 2003. Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: Effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxiatelangiectasia-like disorder mutant complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), pp.45171–45181.
- Lefebvre, T. et al., 2004. The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *European Journal of Biochemistry*, 271(19), pp.3843–3854.
- Li, T. & Wang, Z.Q., 2011. Point mutation at the Nbs1 Threonine 278 site does not affect mouse development, but compromises the Chk2 and Smc1 phosphorylation after DNA damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(8–9), pp.382–388.
- Li, X. et al., 2010. SUMOylation of the Transcriptional Corepressor KAP1 is Regulated by the Serine and Threonine Phosphatase PP1 Xu. *Sci Signal*, 3(119).
- Lin, W.C., Lin, F.T. & Nevins, J.R., 2001. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes and Development*, 15(14), pp.1833–1844.
- Lopez-Contreras, a J. & Fernandez-Capetillo, O., 2012. Signalling DNA Damage. *Intech*, Chapter 8, pp.233–262.
- Lu, H. et al., 2007. Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4-DNA ligase IV activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), pp.11155–11162.
- Lukas, C. et al., 2003. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology*, 5(3), pp.255–260.
- Luo, K. et al., 2012. Sumoylation of MDC1 is important for proper DNA damage response. *The EMBO Journal*, 31(13), pp.3008–3019.
- Ma, Y. et al., 2005. The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human artemis. *Journal of Biological Chemistry*.
- Mailand, N., 2000. Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science*, 288(5470), pp.1425–1429.
- Mailand, N. et al., 2007. RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell*, 131(5), pp.887–900.
- Makharashvili, N. et al., 2014. Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection. *Molecular Cell*, 54(6), pp.1022–1033.
- Mallette, F.A. et al., 2012. RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *The EMBO*



- journal*, 31(8), pp.1865–78.
- Malu, S. et al., 2012. Artemis C-terminal region facilitates V(D)J recombination through its interactions with DNA Ligase IV and DNA-PKcs. *J. Exp. Med*, 209(5), pp.955–963.
- Mamouni, K. et al., 2014. RhoB promotes  $\gamma$ H2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 34(August), pp.3144–3155.
- Mari, P.-O. et al., 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), pp.18597–602.
- Matt, S. & Hofmann, T.G., 2016. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(15), pp.1–22.
- Maya, R. et al., 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 394: role in p53 activation by DNA damage. *Genes and Development*, 15, pp.1067–1077.
- Meek, K. et al., 2007. trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Molecular and cellular biology*, 27(10), pp.3881–90.
- Menchon, G. et al., 2016. Structure-Based Virtual Ligand Screening on the XRCC4/DNA Ligase IV Interface. *Nature Publishing Group*.
- Merkle, D. et al., 2002. The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein - DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry*, 41(42), pp.12706–12714.
- Michela, D.V. & Ying, C.Y., 2009. PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin. *DNA Repair*, 8(11), pp.1311–1320.
- Mimori, T. et al., 1981. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *Journal of Clinical Investigation*.
- Mimori, T., Hardint, J.A. & Steitz, J.A., 1986. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Characterization of the DNA-binding Protein Antigen Ku Recognized by Autoantibodies from Patients with Rheumatic Disorders\*. *The Journal of biological chemistry*, 261(5), pp.2274–2278.
- Mondal, A.M. et al., 2006. Identification and functional characterization of a novel unspliced transcript variant of HIC-1 in human cancer cells exposed to adverse growth conditions. *Cancer Research*, 66(21), pp.10466–10477.
- Morris, J.R. et al., 2009. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, 462(7275), pp.886–90.
- Morton Jr., R.A. et al., 1996. Hypermethylation of chromosome 17P locus D17S5 in human prostate tissue. *Journal of Urology*, 156(2), pp.512–516.
- Muzny, D.M. et al., 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon

- and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), pp.330–337.
- Nakabeppu, Y., 2014. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Negri et al., 2015. Clinical and molecular characterization of Rubinstein-Taybi syndrome patients carrying distinct novel mutations of the EP300 gene. *Clin. Genet.* (87): 148-154
- Nicoll, G. et al., 2001. Expression of the Hypermethylated in Cancer gene (HIC-1) is associated with good outcome in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 85(12), pp.1878–82.
- Nowak, S.J. & Corces, V.G., 2004. Phosphorylation of histone H3: A balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*, 20(4), pp.214–220.
- Ochi, T., Gu, X. & Blundell, T.L., 2013. Structure of the catalytic region of DNA ligase IV in complex with an artemis fragment sheds light on double-strand break repair. *Structure*.
- Ogiwara, H. et al., 2011. Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 30(18), pp.2135–2146.
- Oka, A. & Takashima, S., 1998. Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neuroscience Letters*, 252(3), pp.195–198.
- Ouyang, K.J. et al., 2009. SUMO modification regulates BLM and RAD51 interaction at damaged replication forks. *PLoS Biology*, 7(12).
- Park, J.-H. et al., 2006. Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction. *The EMBO Journal*, 25(17), pp.3986–3997.
- Paull, T.T. & Gellert, M., 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11 / Rad50 complex. *Genes & development*, 13, pp.1276–1288.
- Paull, T.T. & Gellert, M., 1998. The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, 1(7), pp.969–979.
- Peasland, a et al., 2011. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *British journal of cancer*, 105(3), pp.372–381.
- Pinte, S. et al., 2004. Identification of a second G-C-rich promoter conserved in the human, murine and rat tumor suppressor genes HIC1. *Oncogene*, 23(22), pp.4023–31.
- Pinte, S. et al., 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.

- Journal of Biological Chemistry*, 279(37), pp.38313–38324.
- Polo, S.E. et al., 2010. Regulation of DNA-damage responses and cell-cycle progression by the chromatin remodelling factor CHD4. *The EMBO journal*, 29(18), pp.3130–3139.
- Polo, S.E. & Jackson, S.P., 2011. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes & development*, 25(5), pp.409–433.
- Poltoratsky, V.P. et al., 1995. phosphatidylinositol kinases. (DNA-PK) is homologous to Human DNA-activated protein kinase I Human DNA-Activated Protein Kinase (DNA-PK) Is Homologous to Phosphatidylinositol Kinases'. *J Immunol The Journal of Immunology by guest on*, 155, pp.4529–4533.
- Polyak, K. et al., 1994. p27Kip1, a cyclin -CDK inhibitor, links transforming Growth Factor-13 and Contact Inhibition To Cell Cycle Arrest. *Genes & development*, 8, pp.9–22.
- Rass, E. et al., 2013. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is dispensable for endonuclease I-Scei-induced homologous recombination in mouse embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), pp.7086–7095.
- Van Rechem, C. et al., 2010. Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Molecular and cellular biology*, 30(16), pp.4045–4059.
- Van Rechem, C., Rood, B.R., et al., 2009. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (Hypermethylated in cancer 1). *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), pp.20927–20935.
- Van Rechem, C., Boulay, G. & Leprince, D., 2009. HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(4), pp.586–590.
- Reddy, S.S. et al., 2011. Similarities and differences in structure, expression, and functions of VLDLR and ApoER2. *Molecular neurodegeneration*, 6(1), p.30.
- Regal, J.A. et al., 2013. Disease-associated MRE11 mutants impact ATM/ATR DNA damage signaling by distinct mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 22(25), pp.5146–5159.
- Riballo, E. et al., 2009. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Research*, 37(2), pp.482–492.
- Richardson C., Jasin ., 2000. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 405(51), pp.697–700.
- Rogakou, 1997. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of biological chemistry*, 273(10), pp.5858–5868.
- Rogakou, E.P. et al., 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *Journal of Cell Biology*, 146(5), pp.905–915.

- Rood, B.R. et al., 2002. Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma. *Cancer Research*, 62(13), pp.3794–3797.
- Rood, B.R. & Leprince, D., 2013a. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*.
- Rood, B.R. & Leprince, D., 2013b. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17(7), pp.811–27.
- Rupnik, A., Lowndes, N.F. & Grenon, M., 2010. MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 119(2), pp.115–135.
- Santoni de Sio, F.R., 2014. Kruppel-associated box (KRAB) proteins in the adaptive immune system. *Nucleus*, 5(2), pp.138–148.
- Sartori, A.A. et al., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169), pp.509–514.
- Schwartzentruber, J. et al., 2012. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 482(7384), pp.226–231.
- Schwarz, S.E. et al., 1998. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), pp.560–4.
- Serrano, M., Hannon, G.J. & Beach, D., 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366(6456), pp.704–707.
- Shi, F.T. et al., 2013. Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by o-linked n-acetylglucosamine transferase (ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), pp.20776–20784.
- Shiloh, Y., 2003. ATM AND RELATED PROTEIN KINASES: SAFEGUARDING GENOME INTEGRITY. *Nature reviews. Cancer*, 3, pp.155–168.
- Shinozaki, T. et al., 2003. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene*, 22(55), pp.8870–8880.
- Shintani, S. et al., 2003. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer ...*, 94(10), pp.894–900.
- Sibanda, B.L. et al., 2001. Crystal structure of an Xrcc4–DNA ligase IV complex. *Nature*, 8(12), pp.1015–1019.
- Sibanda, B.L., Chirgadze, D.Y. & Blundell, T.L., 2010. Crystal Structure of DNA-PKcs Reveals a Large Open-Ring Cradle Comprised of HEAT Repeats. *Nature*, 463(7277), pp.118–121.
- Silverman, J. et al., 2004. Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes and Development*, 18(17), pp.2108–2119.
- Singleton, B.K. et al., 1997. Molecular and Biochemical Characterization of xrs Mutants Defective in Ku80. *Molecular and cellular biology*, 17(3), pp.1264–1273.

- Singleton, B.K. et al., 1999. The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit. *Molecular and cellular biology*, 19(5), pp.3267–3277.
- Sirzen, F. et al., 1999. DNA-dependent protein kinase content and activity in lung carcinoma cell lines: correlation with intrinsic radiosensitivity. *Eur J Cancer*, 35(1), pp.111–116.
- Smeenk, G. et al., 2010. The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *Journal of Cell Biology*, 190(5), pp.741–749.
- Sood, A.K. et al., 2006. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 12(2), pp.369–375.
- Sorensen, C.S. et al., 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, 3(3), pp.247–258.
- Srivastava, M. et al., 2012. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell*, 151(7), pp.1474–1487.
- Srivastava, M. & Raghavan, S.C., 2015. DNA Double-Strand Break Repair Inhibitors as Cancer Therapeutics. *Chemistry & Biology*, 22(1), pp.1–13.
- Stankovic-Valentin, N. et al., 2007. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Molecular and cellular biology*, 27(7), pp.2661–2675.
- Steffen, J. et al., 2004. Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland. *International Journal of Cancer*, 111(1), pp.67–71.
- Sterner, D.E. & Berger, S.L., 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64(2), pp.435–459.
- Stevens, C., Smith, L. & La Thangue, N.B., 2003. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nature Cell Biology*, 5(5), pp.401–409.
- Stewart, G.S. et al., 1999. The DNA Double-Strand Break Repair Gene hMRE11 Is Mutated in Individuals with an Ataxia-Telangiectasia-like Disorder. *Cell*, 99(6), pp.577–587.
- Stiff, T. et al., 2004. ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Research*, 64(7), pp.2390–2396.
- Stucki, M. et al., 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), pp.1213–1226.
- Sturm, D. et al., 2012. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. *Cancer Cell*, 22(4), pp.425–437.
- Sun, Y. et al., 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), pp.13182–13187.

- Sun, Y. et al., 2007. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), pp.8502–8509.
- Sun, Y. et al., 2009. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the Tip60 tumor suppressor. *NAT CELL BIOL.*, 11(11), pp.1376–1382.
- Swift, M. et al., 1986. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *American journal of human genetics*, 39(5), pp.573–83.
- Taylor, W.R. & Stark, G.R., 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), pp.1803–1815.
- TOMIMATSU, N. et al., 2014. Phosphorylation of EXO1 by CDKs 1 and 2 regulates DNA end resection and repair pathway choice. *NATURE COMMUNICATION*, 5, pp.266–275.
- Uematsu, N. et al., 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*.
- Uhlmann, K. et al., 2003. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *International Journal of Cancer*, 106(1), pp.52–59.
- Urquhart, A.J. et al., 2011. ATM mediated phosphorylation of CHD4 contributes to genome maintenance. *Genome integrity*, 2(1), p.1.
- Usui, T. et al., 1998. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell*, 95(5), pp.705–716.
- Varambally, S. et al., 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(OCTOBER), pp.388–390.
- Vilenchik, M.M. & Knudson, A.G., 2003. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *PNAS*, 100(22), pp.12871–12876.
- Vilgelm, a E. et al., 2010. Characterization of  $\Delta$ Np73 expression and regulation in gastric and esophageal tumors. *Oncogene*, 29(43), pp.5861–5868.
- Villar-garea, A. et al., 2003. Procaine Is a DNA-demethylating Agent with Growth-inhibitory Effects in Human Cancer Cells Procaine Is a DNA-demethylating Agent with Growth-inhibitory Effects in Human. *Cancer Research*, 63, pp.4984–4989.
- Vogelstein, B. et al., 2013. Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), pp.1546–1558.
- Wade Harper, J. et al., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), pp.805–816.
- Wales MM. et al., 1995. p53 activates expression of HIC1, a new candidate tumor suppressor gene on 17p13.3. *Nature Medicine* 1(6):570-577
- Walker, J.E. et al., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal*, 1(8), pp.945–951.
- Walker, J.R., Corpina, R.A. & Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*,

412(6847), pp.607–14.

- Walsh, T. et al., 2011. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), pp.18032–7.
- Wang, C. et al., 2006. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nature cell biology*, 8(9), pp.1025–1031.
- Ward, I.M. & Chen, J., 2001. Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), pp.47759–47762.
- Weber, A.M. & Ryan, A.J., 2015. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 149, pp.124–138.
- Wei, F., Schöler, H.R. & Atchison, M.L., 2007. Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), pp.21551–21560.
- White, D.E. et al., 2006. KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Research*, 66(24), pp.11594–11599.
- White, D.E. et al., 2016. The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: Regulation by HP1 proteins and Serine 473/824 phosphorylation. *molecular cancer research*, 10(3), pp.401–414.
- Williams, R.S. et al., 2008. Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair. *Cell*, 135(1), pp.97–109.
- Willmore, E. et al., 2008. DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14(12), pp.3984–3992.
- Wu, G. et al., 2012. Somatic Histone H3 Alterations in Paediatric Diffuse Intrinsic Pontine Gliomas and Non-Brainstem Glioblastomas. *nat genet*, 44(3), pp.251–253.
- Wu, P.Y. et al., 2007. Interplay between Cernunnos-XLF and nonhomologous end-joining proteins at DNA ends in the cell. *Journal of Biological Chemistry*.
- Wu, X. & Lieber, M.R., 1996. Protein-Protein and Protein-DNA Interaction Regions within the DNA End-Binding Protein Ku70-Ku86. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 16(9), pp.5186–5193.
- Xu, X., Tsvetkov, L.M. & Stern, D.F., 2002. Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and cellular biology*, 22(12), pp.4419–4432.
- Xu, Y. et al., 2010. The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *Journal of Cell Biology*, 191(1), pp.31–43.
- Yan, D. et al., 2010. Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 sensitizes tumors to radiation. *PLoS ONE*, 5(7).
- Yang, S.-H. et al., 2006. An extended consensus motif enhances the specificity of

- substrate modification by SUMO. *The EMBO journal*, 25(21), pp.5083–93.
- Yang, W.H. et al., 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature cell biology*, 8(10), pp.1074–83.
- Yang, X.J. & Grégoire, S., 2006. A Recurrent Phospho-Sumoyl Switch in Transcriptional Repression and Beyond. *Molecular Cell*, 23(6), pp.779–786.
- Yang, X.J. & Grégoire, S., 2006. A Recurrent Phospho-Sumoyl Switch in Transcriptional Repression and Beyond. *Molecular Cell*, 23(6), pp.779–786.
- Yang, Y. et al., 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *NAT CELL BIOL.*, 9(11), pp.1253–1262.
- Yazdi, P.T. et al., 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes and Development*, 16(5), pp.571–582.
- You, Z. et al., 2009. CtIP Links DNA Double-strand Break Sensing to Resection. *Molecular Cell*, 36(6), pp.954–969.
- Yun, M.H. & Hiom, K., 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459(7245), pp.460–463.
- Yurchenko, V., Xue, Z. & Sadofsky, M.J., 2006. SUMO Modification of Human XRCC4 Regulates Its Localization and Function in DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular and Cellular Biology*, 26(5), pp.1786–1794.
- Zachara, N.E. et al., 2011. The dynamic stress-induced “o-GlcNAc-ome” highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids*, 40(3), pp.793–808.
- Zhang, S. et al., 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 18(11), pp.1639–1645. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2919>.
- Zhang, Y. & Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15(18), pp.2343–2360.
- Zhao, S. et al., 2000. Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature*, 405(6785), pp.473–477.
- Zimmermann, M. & Lange, T. de, 2014. 53BP1: Pro Choice in DNA Repair. *trends cell Biol.*, 24(2), pp.108–117.
- Ziv, Y. et al., 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature cell biology*, 8(8), pp.870–876.





# **Annexe**

# Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of BCL11B at Serine 2 Negatively Regulates Its Interaction with NuRD Complexes during CD4<sup>+</sup> T-Cell Activation

Marion Dubuissez,<sup>a\*</sup> Ingrid Loison,<sup>a</sup> Sonia Paget,<sup>a</sup> Han Vorng,<sup>b</sup> Saliha Ait-Yahia,<sup>b</sup> Olivier Rohr,<sup>c,d</sup> Anne Tscipoulos,<sup>b</sup> Dominique Leprince<sup>a</sup>

Université Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161, Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies (M3T), Lille, France<sup>a</sup>; Université Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019, UMR8204, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France<sup>b</sup>; University of Strasbourg, IUT Louis Pasteur, EA7292, Dynamic of Host Pathogen Interactions, Institute of Parasitology and Tropical Pathology, Strasbourg, France<sup>c</sup>; Institut Universitaire de France, Paris, France<sup>d</sup>

**The transcription factor BCL11B/CTIP2 is a major regulatory protein implicated in various aspects of development, function and survival of T cells. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-mediated phosphorylation and SUMOylation modulate BCL11B transcriptional activity, switching it from a repressor in naive murine thymocytes to a transcriptional activator in activated thymocytes. Here, we show that BCL11B interacts via its conserved N-terminal MSRRKQ motif with endogenous MTA1 and MTA3 proteins to recruit various NuRD complexes. Furthermore, we demonstrate that protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation of BCL11B Ser2 does not significantly impact BCL11B SUMOylation but negatively regulates NuRD recruitment by dampening the interaction with MTA1 or MTA3 (MTA1/3) and RbAp46 proteins. We detected increased phosphorylation of BCL11B Ser2 upon *in vivo* activation of transformed and primary human CD4<sup>+</sup> T cells. We show that following activation of CD4<sup>+</sup> T cells, BCL11B still binds to *IL-2* and *Id2* promoters but activates their transcription by recruiting P300 instead of MTA1. Prolonged stimulation results in the direct transcriptional repression of *BCL11B* by KLF4. Our results unveil Ser2 phosphorylation as a new BCL11B posttranslational modification linking PKC signaling pathway to T-cell receptor (TCR) activation and define a simple model for the functional switch of BCL11B from a transcriptional repressor to an activator during TCR activation of human CD4<sup>+</sup> T cells.**

Posttranslational modifications (PTMs) of transcription regulatory proteins allow the integration of various signaling and environmental cues into highly dynamic and controlled responses, thereby achieving coordinated gene expression programs essential for cell proliferation or differentiation.

The transcription factor BCL11B/CTIP2 was independently isolated as an interacting partner of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) in neurons and as a tumor suppressor gene in mouse models of gamma ray-induced thymic lymphomas (1–3). Besides its expression in the central nervous system (CNS), *BCL11B* was shown to be widely expressed in all T-cell subsets, starting from the double-negative stage 2 (DN2 stage) and to be involved in various aspects of development, function, and survival of T cells (4). Indeed, *BCL11B* is a focal point essential for several checkpoints involved in T-cell commitment in early progenitors, selection at the DN2 stage, and differentiation of peripheral T cells (5–9). Furthermore, monoallelic *BCL11B* deletions or missense mutations have been identified in the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia (10). Therefore, these observations together with the occurrence of deletions and mutations in gamma ray-induced thymomas in mice identify *BCL11B* as a haploinsufficient tumor suppressor gene (11).

*BCL11B* is essential for T-cell development and is considered a “guardian of T cell fate” (12). Its closely related paralog *BCL11A* is essential for normal lymphopoiesis and hemoglobin switching during erythroid differentiation (13–15). Thus, these two transcription factors appear to be key regulators of fundamental differentiation programs during normal hematopoiesis.

*BCL11B* represses transcription of its target genes through in-

teraction with several chromatin remodelling complexes and notably recruits NuRD complexes (nuclear remodeling and deacetylation complexes) via interaction with MTA1 and MTA2 (4, 11, 16–18). Although originally characterized as a sequence-specific transcriptional repressor, *BCL11B* also behaves as a context-dependent transcriptional activator of the *IL-2* and *Cot* kinase genes in CD4<sup>+</sup> T-cell activation (19, 20).

This dual behavior of *BCL11B* as a transcriptional repressor and activator is not fully understood but clearly relies on a dynamic cross talk between *BCL11B* PTMs. Indeed, mass spectrometry analyses of thymocytes isolated from 4- to 8-week-old mice and stimulated with a mixture of phorbol ester and calcium ionophore used as an *in vitro* model mimicking T-cell receptor (TCR) activation identified several mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation sites of *BCL11B* and confirmed its

Received 25 January 2016 Returned for modification 16 February 2016

Accepted 3 May 2016

Accepted manuscript posted online 9 May 2016

Citation Dubuissez M, Loison I, Paget S, Vorng H, Ait-Yahia S, Rohr O, Tscipoulos A, Leprince D. 2016. Protein kinase C-mediated phosphorylation of BCL11B at serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4<sup>+</sup> T-cell activation. *Mol Cell Biol* 36:1881–1898. doi:10.1128/MCB.00062-16.

Address correspondence to Dominique Leprince, dominique.leprince@ibl.cnrs.fr.

\* Present address: Marion Dubuissez, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00062-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

SUMOylation on lysine 679 (21). These phosphorylation events then initiate a rapid and complex cycle of BCL11B PTMs including deSUMOylation, rephosphorylation, and reSUMOylation, allowing recruitment of the transcriptional coactivator P300 to activate *Id2* transcription (21, 22).

Here, we found that BCL11B interacts with the three MTA (metastasis-associated gene) family members through its conserved N-terminal MSRRKQ motif, which is embedded in a potential protein kinase C (PKC) phosphorylation consensus site. We demonstrated that an S2D phosphomimetic point mutation is sufficient to abolish the interaction of BCL11B with all MTA corepressors and hence with a wide range of NuRD complexes. Through generation of phosphospecific antibodies, we identified *in vivo* serine 2 phosphorylation of endogenous BCL11B proteins. We found that activation of transformed Jurkat or primary human CD4<sup>+</sup> T cells results in a rapid and transient PKC-induced phosphorylation of this BCL11B Ser2 culminating at 30 min of treatment. In contrast with the MAPK-induced phosphorylations in late T-cell development, this PKC phosphorylation peak precedes and does not affect the SUMOylation peak during activation of CD4<sup>+</sup> T cells. After prolonged activation (5 h), the decrease of BCL11B protein levels observed is due to the direct transcriptional repression of *BCL11B* by KLF4. As shown by coimmunoprecipitation of endogenous proteins and chromatin immunoprecipitation experiments, this BCL11B Ser2 phosphorylation through decreased interaction with MTA1 and concomitant increased interaction with P300 contributes to a strong transcriptional up-regulation of *Id2* and *IL-2*, two BCL11B direct target genes, during CD4<sup>+</sup> T-cell activation. A PKC inhibitor, Gö6983 abolishes this corepressor/coactivator switch in Jurkat cells. Thus, our findings identify BCL11B Ser2 phosphorylation as a new mandatory step in the interconnected posttranslational modifications converting BCL11B from a transcriptional repressor to an activator and provide compelling evidence that together with SUMOylation this PKC-mediated phosphorylation is essential for transcriptional activation of *IL-2* during human CD4<sup>+</sup> T-cell activation.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** HEK293T cells were maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), nonessential amino acids, and gentamicin. Jurkat and MOLT4 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% FCS, nonessential amino acids, and penicillin-streptomycin.

**Isolation and activation of human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.** Donor blood samples were provided by Etablissement Français du Sang (EFS) (Nord de France), in agreement with the official ethics statement between EFS and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)–Délégation Nord Pas-de-Calais et Picardie. The study was approved by the Institut de Biologie de Lille (CNRS) and EFS Institutional Review Board, and informed consent was obtained in writing for each donor. Isolation of human CD4<sup>+</sup> T cells was performed as previously described (23). Briefly, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and CD4<sup>+</sup> T cells were obtained by negative selection using CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit II according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). The purity was determined by flow cytometry, and was always ≥95%. CD4<sup>+</sup> cells (10<sup>6</sup> cells/ml) were cultured in complete RPMI 1640 medium (RPMI 1640 medium [Gibco, Carlsbad, CA], 10% heat-inactivated fetal calf serum [Gibco], 2 mM L-glutamine) and stimulated or not stimulated in 96-well flat-bottomed microculture plates coated with anti-CD3 antibodies (10 μg/ml; OKT3 clone) and soluble anti-CD28 antibodies (2 μg/ml; BD Biosciences) for 24 h or with

phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) and ionomycin (1 μg/ml) for 5 h. Cells were then recovered by centrifugation for further analyses.

**Plasmids and chemicals.** The MTA1, MTA3, SENP2, and BCL11A expression vectors were kind gifts of R. Kumar, P. Wade, R. Hay, and P. Tucker, respectively. The various BCL11B-Gal4 expression constructs used in this study were generated as follows. Using the wild-type (WT) pcDNA3-FLAG-BCL11B plasmid (17, 24) as a template and using relevant oligonucleotides, we PCR amplified fragments corresponding to amino acids 1 to 20 and 1 to 58 of wild-type BCL11B as well as 1 to 20 fragments with point mutations of serine 2 (S2A, S2D, and S2T). Next, these fragments were cloned in frame with a C-terminal Gal4 DNA-binding domain followed by a nuclear localization signal (NLS) and a hemagglutinin (HA) epitope into the pSG5-Gal4-NLS-HA eukaryotic vector to mimic their location in the full-length protein (25). The point (S2A and S2D) and deletion (ΔMSRRKQ) mutants of BCL11B were PCR amplified from the WT BCL11B plasmid with relevant oligonucleotides and subcloned in pcDNA3-FLAG-BCL11B using standard procedures. All constructs were verified by sequencing. PMA and ionomycin (both from Sigma-Aldrich) were used at a final concentration of 50 ng/ml and 1 μg/ml, respectively. Bisindolylmaleimide II (BIMII) (used at a final concentration of 10 μM for 30 min) and Gö6983 (used at a final concentration of 1 μM for 15 min) which are general inhibitors of protein kinase C (PKC) subtypes were purchased from Sigma-Aldrich and Selleckchem, respectively (26–28). The MEK inhibitor U0126 was purchased from Merck Millipore and used at a final concentration of 10 μM for 30 min. Okadaic acid (OA) and calyculin A (Cal. A), which are potent inhibitors of all three type 2A Ser/Thr phosphatases (PP1, PP2A, and PP6) (29), were both obtained from Santa Cruz. Okadaic acid and calyculin A were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at a final concentration of 1 μM and 50 nM, respectively. Calyculin A also inhibits arsenic-induced PML (promyelocytic leukemia protein) SUMOylation (30) and BCL11B SUMOylation (21, 31). The SUMOylation inhibitors 2-D08 [2',3',4'-trihydroxy-flavone, 2-(2,3,4-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one], which is specific and blocks SUMO (small ubiquitin-like modifier) transfer from the Ubc9-thioester complex to the substrates (32), and anacardic acid, which blocks SUMOylation without affecting ubiquitination (33), were both obtained from Sigma and used at a final concentration of 50 μM (34). Anacardic acid is also a potent inhibitor of several histone acetyltransferase (HATs) such as PCAF (P300/CBP-associated factor), P300, and TIP60 (35).

**Transfection, immunoprecipitation, and coimmunoprecipitation.** Cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the polyethylenimine (PEI) method using ExGen 500 (Euromedex), as previously described with 2.5 μg of DNA corresponding to the relevant expression vectors or the empty vector used as a control. Cells were transfected for 6 h and then incubated in fresh complete medium. After 48 h of transfection, cells were rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in cold IPH buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, protease inhibitor cocktail [Roche]) for coimmunoprecipitation. Cell lysates were sonicated briefly and cleared by centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 15 min). The supernatants were precleared with 15 μl of protein A/G-Sepharose beads (Amersham Bioscience) incubating for 1 h on a rotator at 4°C. Then, lysates were incubated with 2 μg of antibody on a rotator at 4°C overnight. Later, 20-μl volumes of protein A/G beads were added and incubated for 30 min at 4°C. Finally, the beads were washed three times with IPH buffer. Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer (36).

To detect SUMOylation of endogenous BCL11B proteins by immunoprecipitation studies, Jurkat cells were lysed in a lysis buffer containing 1% SDS, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 15 mM N-ethylmaleimide (NEM). These cell extracts were immediately boiled for 10 min and diluted in 9 volumes of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol) supplemented with 10

mM NEM and protease inhibitor cocktail for immunoprecipitation with anti-BCL11B antibodies (37).

To detect endogenous interactions between BCL11 (BCL11A or -B) and MTA (MTA1 or -3) proteins, we prepared the combined cytoplasmic and nucleoplasmic fractions and the micrococcal nuclease-solubilized chromatin fractions as previously described (36, 38, 39). Two chromatin fractions prepared in parallel from the same number of cells were analyzed in coimmunoprecipitation assays as described above, with control rabbit IgG or MTA1- and MTA3-specific antibodies.

**Transfection and luciferase transactivation test.** HEK293T cells were plated in 12-well CellBind plates (Corning) and transfected with 500 ng of DNA for 6 h in triplicate with the luciferase reporter plasmid pGL3-5xGal4RE-tk luc (luciferase expression under the control of Gal4-responsive elements) or the pGL3-empty vector in combination with various BCL11B-Gal4 constructs and then incubated in fresh complete medium. Forty-eight hours after transfection, cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed in the luciferase assay buffer. After normalization to the  $\beta$ -galactosidase activity, the data were expressed as the luciferase activity relative to the activity of pGL3-Luc with pSG5-Gal4-NLS-HA, which represents the basal condition and was given an arbitrary value of 1. The results represent the mean values from three independent transfections in triplicate. Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured using, respectively, beetle luciferin (Promega) and the Galacto-Light kit (Tropix) with a Berthold chemiluminometer (36).

**Antibodies and Western blot analyses.** To generate polyclonal antibodies against phosphorylated serine 2 of BCL11B, control and phosphorylated peptides corresponding to amino acids 1 to 19 of human BCL11B [ $\text{H}_2\text{N-MS}(\text{PO}_3\text{H}_2)\text{RRKQGNPQHLC-CONH}_2$ ] peptide were synthesized, coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and used to immunize rabbit (Eurogentec, Belgium). Control and phosphospecific antibodies were purified by affinity chromatography using standard protocols. The following commercial antibodies were used: anti-FLAG M2 from Sigma; anti-HA from BABC0; anti-BCL11B (ab18465 for Western blotting [WB], ab28448 for immunoprecipitation [IP] and chromatin immunoprecipitation [ChIP], and A300-383A for IP) from Abcam and Bethyl Laboratories; anti-phospho-Erk1/2 (9106) from Cell Signaling; antiactin (sc-1616R); anti-MTA1 (sc-9445 for WB, sc-10813 for IP, and sc-10813 or ab50263 for ChIP) from Santa Cruz and Abcam; anti-MTA3 (ab87275) from Abcam; anti-Erk2 (sc-154) from Santa Cruz; anti-HDAC2 (sc-7899 H-54) from Santa Cruz; anti-CHD4 (ab70469) from Abcam; anti-RbAP46 (sc-8272) from Santa Cruz; anti-RbAP48 (C15200206 for ChIP) from Diagenode; anti-phospho-PKC substrate (2261) from Cell Signaling; anti-KLF4 (ab106629) and anti-RanGAP1 (ab92360) from Abcam.

Western blotting was performed as previously described (40). The secondary antibodies were horseradish peroxidase-linked antibodies against rabbit, rat, goat, and mouse immunoglobulins (Amersham Biosciences) and goat immunoglobulins (Southern Biotech).

To analyze the SUMOylation of BCL11B proteins by Western blotting analyses, transfected HEK293T cells or Jurkat and human CD4<sup>+</sup> T cells pelleted by centrifugation were directly lysed in Laemmli loading buffer, boiled for 10 min, and processed for Western blotting as described above.

**Chromatin immunoprecipitation.** Control or activated Jurkat and primary human CD4<sup>+</sup> T cells were washed with PBS and resuspended in 0.5 ml PBS for  $5 \times 10^6$  cells. Then, cells were fixed by adding formaldehyde to a final concentration of 1% for 8 min at room temperature. To stop fixation, glycine was added to a final concentration of 0.125 M. After 5 min at room temperature, cells were collected by centrifugation (1,500 rpm at 4°C for 5 min). The supernatants were removed and cells were lysed by resuspension in chilled cell lysis buffer for 10 min on a rotator at 4°C. Then, the samples were pelleted, resuspended in 200  $\mu$ l nucleus lysis buffer and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a cooling BioRuptor (Diagenode, Belgium). Twenty micrograms of chromatin was immunoprecipitated with the antibodies indicated in the figures, and real-time PCR analyses were performed as described previously (36). The primers used are summarized in Table S1 in the supplemental

material. For the *IL-2* promoter, we designed primers around the BCL11B US1 (upstream site 1) binding sites (19). For the *Id2* promoter, the transcription start site (TSS) is derived from the *Id2* human locus found in the NCBI Nucleotide database (gi: 568815596). The region just upstream of the TSS contains several BCL11B binding sites as shown by chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) analyses of BCL11B binding in double-positive human thymocytes (9). Clustal alignments of the corresponding human and murine regions highlighted a conserved potential BCL11B direct binding site, TGGGC, which has been analyzed in ChIP-quantitative PCR (qPCR) experiments using relevant oligonucleotides. Similar analyses identified a potential KLF4 binding site in the *BCL11B* promoter. For the ChIP in the presence of the PKC inhibitors, Jurkat cells were first incubated with Gö6983 (1  $\mu$ M for 15 min) before the relevant activation treatment.

**Real-time and quantitative PCR.** Total RNAs were reverse transcribed using random primers and MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR (RT-PCR) analyses were performed by Power SYBR green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to the values for 18S RNA used as an internal control. The primers used are summarized in Table S2 in the supplemental material.

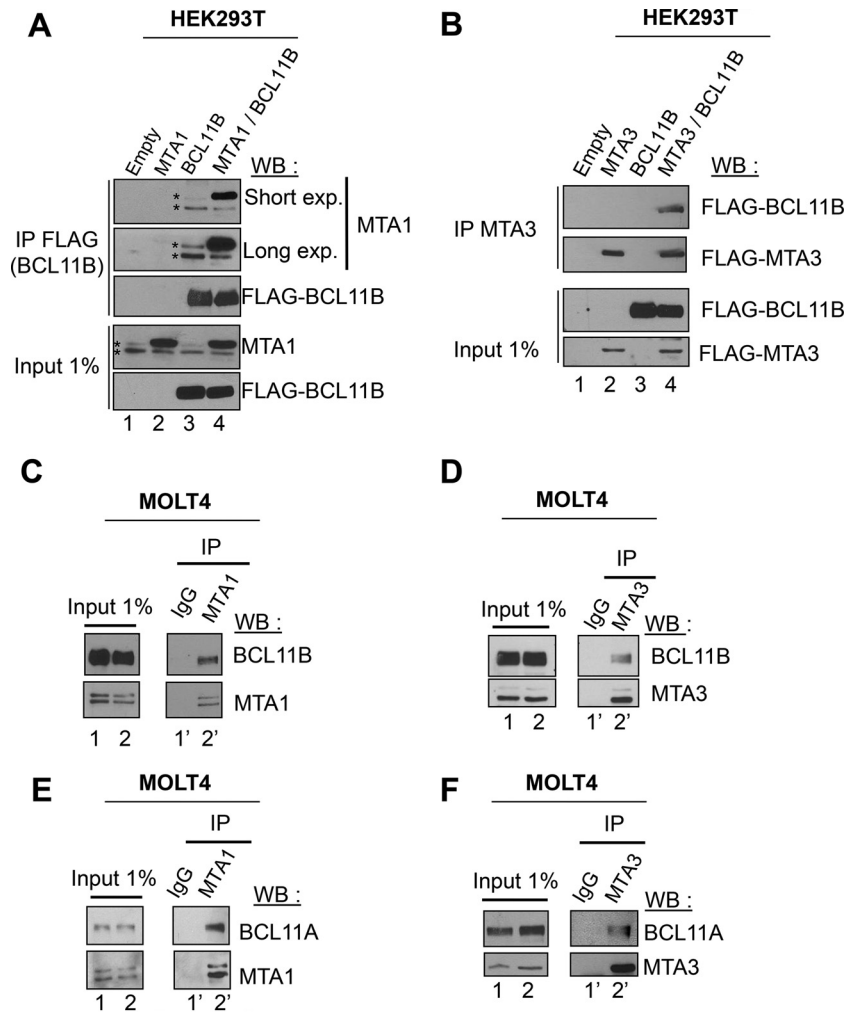
**Statistics.** Experiments were performed at least two or three times independently. Statistical analyses were performed by Student's *t* test.

## RESULTS

**BCL11B interacts with the three MTA proteins.** The three MTA proteins, MTA1, MTA2, and MTA3, are found in a mutually exclusive manner in different specialized NuRD complexes (41, 42). BCL11B interacts with the closely related MTA1 and MTA2 proteins (18). Therefore, we investigated whether BCL11B also interacts with the functionally distinct MTA3 protein. Coimmunoprecipitation experiments (Co-IPs) in transiently transfected HEK293T cells (Fig. 1A and B) or between endogenous proteins in the human acute lymphoblastic leukemia cell line MOLT4 (Fig. 1C and D) and in the human CD4<sup>+</sup> T-cell line Jurkat (see Fig. S1A and B in the supplemental material) (19) demonstrated that BCL11B interacts with MTA1 and MTA3. Unlike Jurkat cells, MOLT4 cells express both BCL11B and BCL11A but with lower levels of MTA1 and MTA3 (see Fig. S1C to F) (43, 44). Similarly, we unraveled an interaction between BCL11A and MTA1 or MTA3 proteins either ectopically expressed in HEK293T cells (see Fig. S1G and H) or endogenously expressed in MOLT4 cells (Fig. 1E and F). Taken together, these results demonstrate that BCL11B and BCL11A can interact with the MTA1 or MTA2 (MTA1/MTA2) and MTA3 proteins and hence with a wide variety of NuRD complexes.

**Mimicked phosphorylation of the BCL11B N-terminal domain (S2D) disrupts its interaction with MTA proteins and relieves its transcriptional repression activity.** Amino acids 1 to 45 of BCL11B containing the MSRRKQ motif shared with FOG1 and SALL1 are sufficient for the interaction with MTA1 in glutathione *S*-transferase (GST) pulldown experiments (18, 26, 45, 46). To assess this interaction *in vivo*, we fused amino acids 1 to 20 or amino acids 1 to 58 of BCL11B in frame with a C-terminal Gal4 DNA-binding domain (Fig. 2A). Transient-transfection assays in HEK293T cells demonstrated that these 1-20- and 1-58-BCL11B-Gal4 chimeras are nuclear, interact with MTA1 and MTA3 and mediate strong transcriptional repression in luciferase reporter assays (Fig. 2B to D) (see Fig. S2A to C in the supplemental material). Serine 2 (Ser2) of the conserved MSRRKQ motif is embedded in a potential consensus site (S/T-X<sub>2-0</sub>-R/K<sub>1-3</sub>) for phosphor-





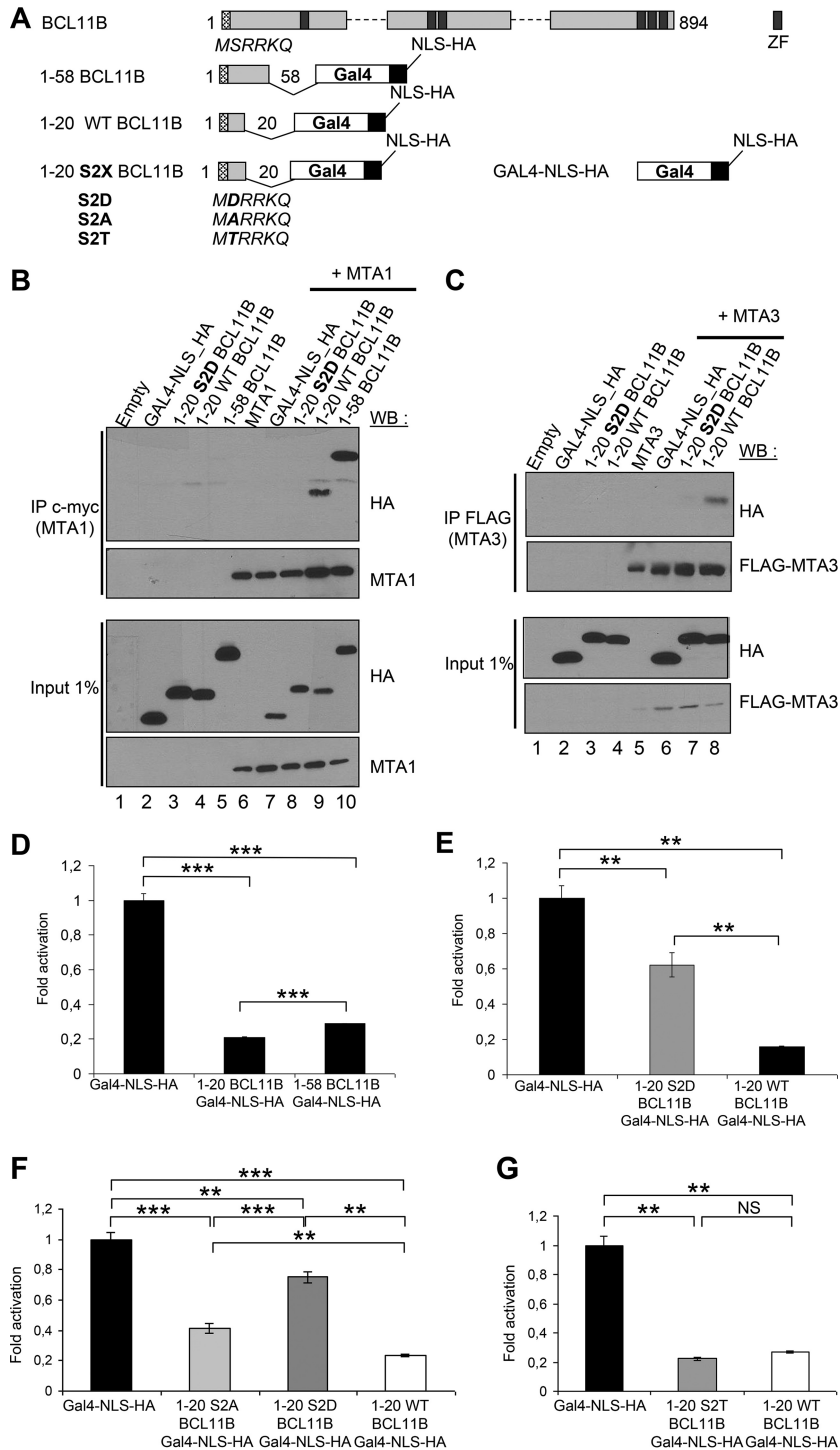
**FIG 1** BCL11A and BCL11B interact with MTA1 and MTA3. (A) MTA1 interacts with BCL11B. HEK293T cells were transfected with MTA1 and BCL11B expression vectors. Whole-cell extracts incubated with anti-FLAG antibodies (immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies [IP FLAG]) and 1% of each lysate (Input 1%) were immunoblotted with the indicated antibodies. FLAG-BCL11B coimmunoprecipitated endogenous MTA1 proteins (lane 3) visualized as a doublet (indicated by an asterisk). Short and long exposures (exp.) for Western blotting (WB) are indicated. (B) BCL11B interacts with MTA3. A similar experiment was conducted in HEK293T cells with BCL11B and MTA3 expression vectors. (C) Endogenous BCL11B and MTA1 proteins interact. Solubilized chromatin fractions were prepared in duplicate from the same number of MOLT4 cells, and 1% was retained for direct analyses by Western blotting (Input 1%). The interaction between BCL11B and MTA1 was evaluated by coimmunoprecipitation assays. (D to F) Endogenous BCL11B and MTA3 (D), BCL11A and MTA1 (E), and BCL11A and MTA3 (F) proteins interact in MOLT4 cells. The same procedure was used for panels C to E.

ylation by protein kinase C (PKC), a family of serine/threonine kinases involved in many cellular functions, including T-cell activation (47, 48). To study the importance of Ser2 and the effect of its potential phosphorylation, we constructed several point mutants of Ser2 (S2X) in the 1-20-BCL11B-Gal4 chimera (Fig. 2A). First, the phosphomimetic S2D mutant is unable to coimmunoprecipitate MTA1 or MTA3 protein, and in luciferase transactivation assays, its repression activity is significantly inhibited (Fig. 2B to F; see Fig. S2). In addition, the repression activity of the phosphodeficient S2A mutant is also inhibited (49), whereas a serine-to-threonine substitution (S2T) has no significant impact on the repression potential of the BCL11B-Gal4 chimera (Fig. 2F and G; see Fig. S2).

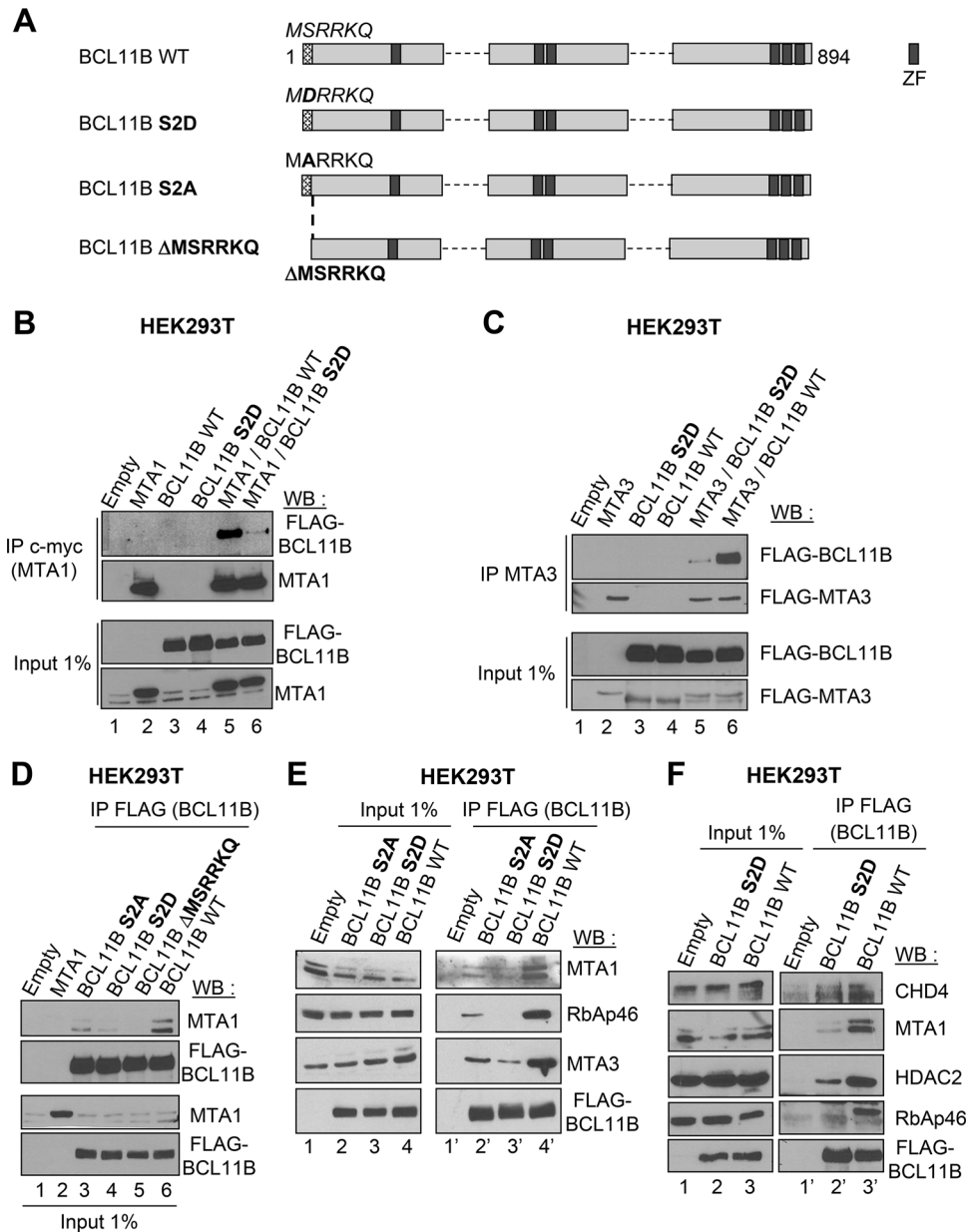
Thus, the first 20 amino acids of BCL11B, including the conserved MSRRKQ motif, are sufficient to interact with MTA1 or MTA3 and have autonomous repression activity. Ser2 is impor-

tant for these two properties, which are severely impaired by a phosphomimetic point mutation, S2D.

**A phosphomimetic mutation of BCL11B Ser2, S2D, impedes NuRD recruitment.** We engineered an S2D and S2A full-length BCL11B point mutant and a deletion mutant, BCL11B ΔMSRRKQ (Fig. 3A). They all display a nuclear localization (see Fig. S2G in the supplemental material). In Co-IPs, the phosphomimetic S2D mutant weakly interacts with MTA1 and MTA3 overexpressed in HEK293T cells (Fig. 3B and C). Similarly, Co-IP assays demonstrated that the S2A and S2D point mutants ectopically expressed in HEK293T cells still weakly interact with endogenous MTA1 proteins, whereas the ΔMSRRKQ deletion mutant is unable to do so (Fig. 3D). The MSRRKQ motif of FOG1 also interacts with RbAp48 (49). We thus investigated the interaction of these mutants with other endogenous components of NuRD. We demonstrated that the S2A mutant still significantly interacts



**FIG 2** Ser2 in the conserved N-terminal motif of BCL11B is essential for its interaction with MTA1 and MTA3 and for its transcriptional repression activity. (A) Schematic drawing of the BCL11B-Gal4 (DNA-binding domain)-NLS (nuclear localization signal)-HA fusion proteins. ZF, zinc finger. (B) A phosphomimetic point mutation S2D in the BCL11B N-terminal domain inhibits its interaction with MTA1. After transfection with the indicated expression vectors, HEK293T cell lysates were immunoprecipitated with anti-c-myc antibodies (IP c-myc). Immunoprecipitated samples and 1% of whole-cell extracts (Input) were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) The BCL11B-MTA3 interaction is also negatively regulated by the S2D mutation. A similar experiment was performed in HEK293T cells with a FLAG-MTA3 plasmid and the BCL11B-Gal4 chimeras. (D) The conserved BCL11B N-terminal domain represses transcription. The transcriptional activity of BCL11B-Gal4 constructs was tested by transient luciferase reporter assays in HEK293T cells. The results represent the mean values from three independent transfections in triplicate. (E) The S2D phosphomimetic mutation in the BCL11B N-terminal domain partially inhibits its transcriptional repression potential. A similar luciferase reporter assay was conducted in HEK293T cells with the wild-type (WT) 1-20 BCL11B and the S2D point mutant. (F and G) Repression potential of the various S2X point mutants BCL11B N-terminal domain. Luciferase reporter assays were conducted with the S2A, S2D, S2T, and WT BCL11B-Gal4 constructs as described above. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Values that are not statistically significantly different (NS) are also indicated.



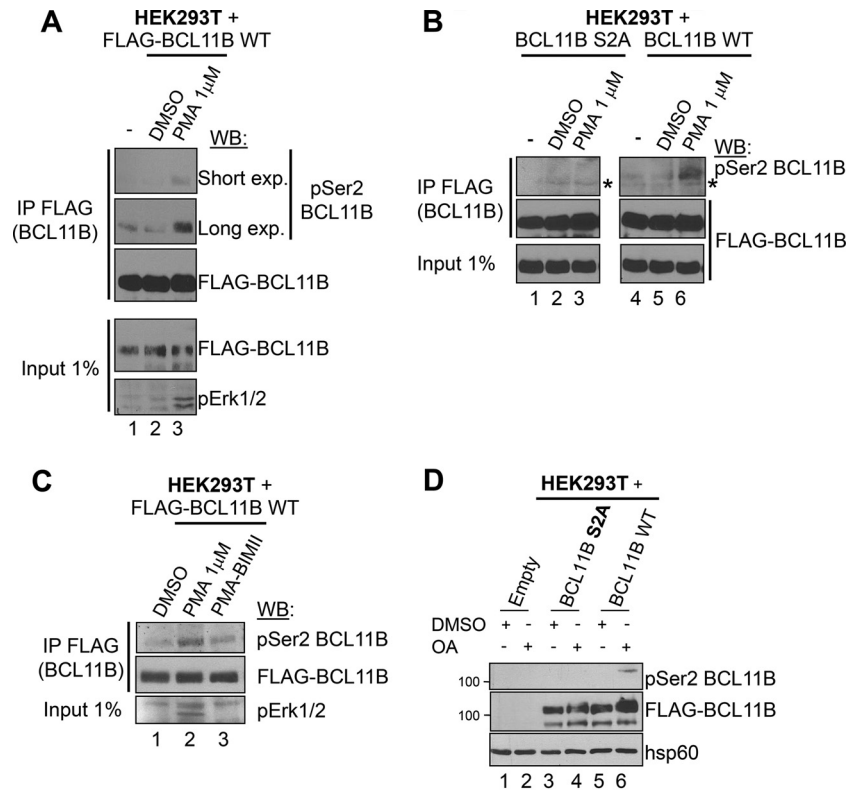
**FIG 3** The phosphomimetic S2D mutation in BCL11B inhibits NuRD recruitment. (A) Schematic drawing of the full-length BCL11B proteins tested. (B) The interaction with MTA1 is impaired by the S2D phosphomimetic mutation of BCL11B. HEK293T cells were transfected with the indicated combination of expression vectors, and Co-IP assays followed by immunoblotting with the indicated antibodies were performed. (C) The BCL11B-MTA3 interaction is also strongly reduced by the S2D phosphomimetic mutation. A similar Co-IP experiment was performed with HEK293T cells but with the FLAG-MTA3 expression vector. Relevant pieces of the membranes were cut (around the 80-kDa marker) to separate the MTA3 and BCL11B proteins and probed with anti-FLAG antibodies. (D) Interaction of wild-type (WT), S2A, S2D, and  $\Delta$ MSRRKQ BCL11B with endogenous MTA1 proteins. Total extracts of HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were analyzed by Co-IP with anti-FLAG antibodies and immunoblotted with MTA1 and FLAG antibodies. (E and F) Interaction of the S2A and S2D BCL11B point mutants with endogenous NuRD components. Co-IP experiments followed by immunoblotting with the indicated antibodies were performed as in panel D with the S2A and S2D (E) or S2D (F) BCL11B mutants.

with MTA1, MTA3, and RbAp46 compared to wild-type (WT) BCL11B (Fig. 3E). In contrast, the S2D mutant is totally unable to interact with endogenous RbAp46, whereas it weakly interacts with MTA1, MTA3, CHD4, and HDAC2 (Fig. 3E and F). These results are in close agreement with the crystallographic structure of the FOG (friend of GATA) peptide consisting of amino acids 1 to 15 bound to RbAp48, since Ser2 is engaged in hydrogen bond interaction, whereas the adjacent Arg3, Arg4, and Lys5 participate

in ion pair contacts with Glu residues in RbAp48 (49). Thus, an S2D phosphomimetic mutation in the N-terminal MSRRKQ motif of BCL11B negatively regulates the interactions with several endogenous NuRD components.

**BCL11B is phosphorylated by PKC on Ser2 upon PMA activation of HEK293T cells and is SUMOylated.** Next, we raised antibodies against phospho-Ser2 BCL11B that were able to detect phosphorylation of BCL11B on the Ser2 residue in trans-





**FIG 4** Phosphorylation of BCL11B Ser2 in HEK293T cells upon PKC activation. (A) PMA-induced *in vitro* phosphorylation of BCL11B Ser2. HEK293T cells transfected with FLAG-BCL11B were mock treated (–) or incubated with vehicle (DMSO) or with PMA (1  $\mu$ M) for 20 min. Immunoprecipitated samples (IP FLAG) and input lysates were analyzed by immunoblotting with antibodies specific for phosphorylated Ser2 (pSer2 BCL11B) and FLAG as a control. (B) Specificity of the anti-pSer2 BCL11B antibodies. A similar experiment was performed to compare the BCL11B S2A mutant and WT BCL11B in the three conditions. The position of a nonspecific band is indicated by an asterisk. (C) PKC is implicated in BCL11B Ser2 phosphorylation. HEK293T cells were transfected with BCL11B and activated exactly as in panel A. One plate was preincubated with the pan-PKC inhibitor BIMII before PMA activation. The PKC inhibitor also partially inhibits Erk activation as previously shown (50). (D) The phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) allows detection of BCL11B Ser2 phosphorylation in basal conditions. HEK293T cells transfected with the indicated expression vectors were incubated with DMSO (+) or treated with OA (+). Total cell lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

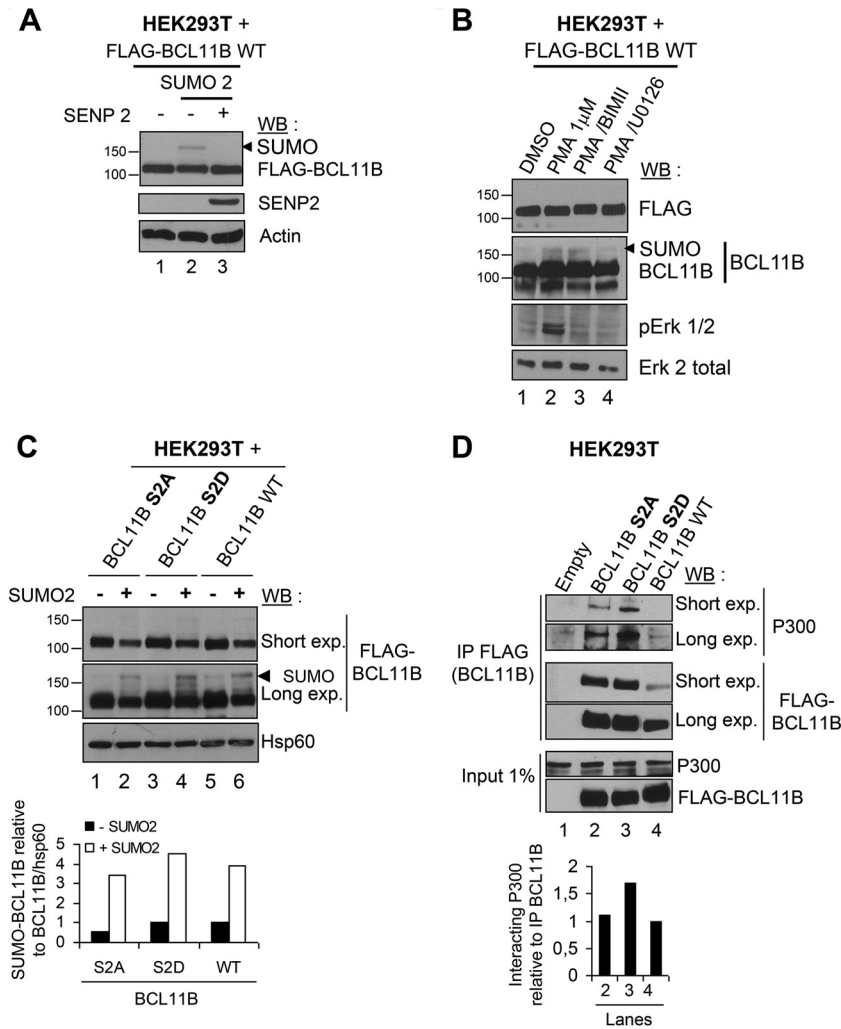
fecting HEK293T cells treated with PMA, a potent PKC activator (48) (Fig. 4A) (see Fig. S3 in the supplemental material). These antibodies detected strong induction of Ser2 phosphorylation after overexpression of WT BCL11B but not of the S2A mutant in PMA-treated HEK293T cells, thereby demonstrating their specificity (Fig. 4B). Finally, addition of BIMII, a PKC inhibitor decreased BCL11B phosphorylation on Ser2, whereas okadaic acid, a Ser/Thr phosphatase inhibitor, increased it (Fig. 4C and D).

In phorbol 12,13-dibutyrate and A23187 (P/A)-stimulated murine thymocytes, BCL11B is SUMOylated (21). In PMA-activated HEK293T cells transfected with BCL11B, we also observed a slowly migrating band (above the 150-kDa marker) which corresponds to the SUMOylation of BCL11B, since it totally disappeared upon cotransfection of the deSUMOylase SENP2 (Fig. 5A) (see Fig. S3 in the supplemental material). In addition, the PKC inhibitor BIMII seems to have no significant effect on the SUMOylation level of BCL11B, while the extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor U0126 seemed to slightly reduce it (Fig. 5B). The PKC inhibitor also partially inhibits Erk activation as previously shown (50). BCL11B SUMOylation is important for its interaction with p300 (21). Interestingly, whereas the S2A and S2D point mutants are severely affected in their interaction with

MTA1 compared with WT BCL11B (Fig. 3), they display similar levels of SUMOylation and hence of interaction with endogenous p300 proteins (Fig. 5C and D), correlating the lack of significant effects of the PKC inhibitor on BCL11B SUMOylation.

Thus, the PKC-mediated phosphorylation of BCL11B in HEK293T cells impinges on its interaction with MTA1 but not on its SUMOylation and interaction with P300.

**PKC-mediated Ser2 phosphorylation of endogenous BCL11B proteins upon PMA-ionomycin activation of Jurkat cells has no impact on its SUMOylation.** We next addressed this PKC-mediated Ser2 phosphorylation on endogenous BCL11B proteins during human CD4<sup>+</sup> T-cell activation. Western blot analyses of Jurkat cell extracts with the anti-pSer2 BCL11B serum confirmed a peak of transient phosphorylation of BCL11B Ser2 after 30 min of activation with PMA-ionomycin (P/I) (Fig. 6A). Immunoprecipitation of Jurkat cell extracts by a C-terminal BCL11B antibody followed by Western blotting analyses with the anti-pSer2 BCL11B serum identified BCL11B proteins phosphorylated on serine 2 upon T-cell activation, notably in the presence of the phosphatase inhibitor okadaic acid (Fig. 6B). Treatment with okadaic acid induced a supershift of BCL11B both in basal and activated conditions due to its phosphorylation by ERK and PKC pathways as detected by the anti-pSer2 antibodies (Fig. 6B, lane 3,

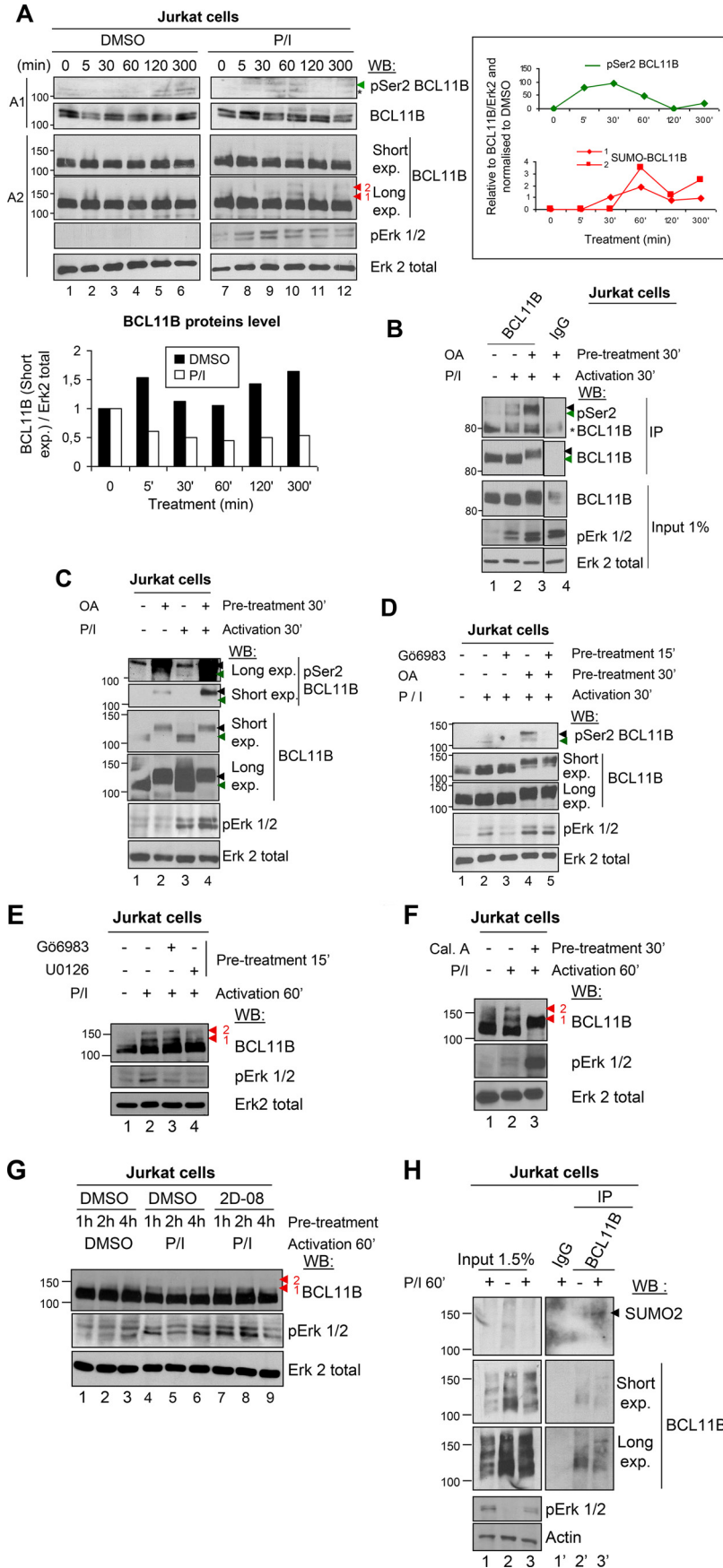


**FIG 5** BCL11B SUMOylation in HEK293T cells is independent of Ser2 phosphorylation. (A) BCL11B is SUMOylated. Total cell extracts of HEK293T cells transfected with the indicated combinations of BCL11B, SUMO2, and the deSUMOylase SENP2 were prepared in denaturing conditions and immunoblotted with indicated antibodies. The position of the SUMOylated form of BCL11B is indicated by the arrowhead. The positions of molecular markers are indicated to the left of the blot. (B) The PKC pathway does not affect BCL11B SUMOylation in contrast with the ERK pathway. HEK293T cells were transfected with BCL11B and preincubated with the PKC inhibitor BIM1 or with the Erk1/2 inhibitor U0126 before PMA activation. The PKC inhibitor also partially inhibits Erk activation as previously shown (50). Total cell extracts prepared in denaturing conditions were immunoblotted as indicated. (C) The S2D and S2A point mutations have no significant impact on BCL11B SUMOylation. HEK293T cells were transfected as indicated, lysed in denaturing conditions, and immunoblotted with anti-FLAG antibodies to detect BCL11B and its SUMOylated forms. Hsp60 was used to quantify the ratio of SUMOylated BCL11B to total BCL11B using Fujifilm MultiGauge software. The value obtained for BCL11B WT in the absence of SUMO2 (lane 5) was set at 1. (D) The S2D and S2A point mutations do not affect BCL11B interaction with endogenous P300 proteins. HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were subjected to Co-IP analyses with anti-FLAG antibodies followed by immunoblotting with P300 or FLAG antibodies. The ratio of interacting P300 relative to BCL11B was measured as described above for panel C.

and Fig. 6C, lanes 2 and 4). Furthermore, Ser2 phosphorylation observed in the presence of okadaic acid is lost if, before activation, cells are treated with the PKC inhibitor G66983, whereas the supershift of BCL11B is still observed (Fig. 6D, lanes 4 and 5).

In activated Jurkat cells, BCL11B phosphorylation is transient and precedes its SUMOylation (Fig. 6A). As observed in HEK293T cells, the PKC inhibitor seems to have no significant effects on BCL11B SUMOylation after 60 min of activation, whereas ERK inhibition by U0126 seems to slightly decrease it (Fig. 6E). Another Ser/Thr phosphatase inhibitor, calyculin A, is also a SUMOylation inhibitor as initially shown for PML (30) and

later for BCL11B (21, 31). Upon activation and calyculin A treatment of Jurkat cells, we observed an electromobility shift for the major BCL11B proteins, whereas the slowest migrating BCL11B-SUMO band totally disappeared (Fig. 6F), as shown in murine thymocytes (21). Similar results were obtained with the specific SUMOylation inhibitor 2-D08 (32, 34) (Fig. 6G) and with anacardic acid (AA), an inhibitor of SUMOylation (33) and of various histone acetyltransferase (HATs) (35). This might explain through transcriptional inhibition, the decrease of BCL11B protein levels as well as of several SUMOylated proteins observed with AA (see Fig. S5 in the supplemental material). Finally, Western blot analyses with anti-SUMO-2 after immunoprecipitation



of endogenous BCL11B proteins under denaturing conditions allowed the detection of SUMOylated BCL11B proteins in activated Jurkat cells (Fig. 6H) (37). As a whole, these data identify phosphorylation of BCL11B Ser2 by PKC as a new posttranslational modification of BCL11B during human CD4<sup>+</sup> T-cell activation, preceding and acting independently of its SUMOylation.

**KLF4 directly represses BCL11B transcription upon PMA-ionomycin activation of Jurkat cells.** SUMOylation of BCL11B in P/A-treated murine thymocytes ultimately results in its ubiquitination and degradation (21). However, whereas prolonged stimulation of Jurkat cells with P/I also resulted in a decrease of BCL11B protein levels after 5 h (Fig. 6A), this correlated with transcriptional repression of *BCL11B*, rather than degradation after ubiquitination (see Fig. S5 in the supplemental material). Indeed, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analyses demonstrated a strong decrease of BCL11B mRNAs starting at 2 h of stimulation (Fig. 7A). Furthermore, BCL11B protein levels decreased after 5 h of P/I stimulation, even in the presence of three different proteasome inhibitors, MG132, acetyl-Leu-Leu-Nle-aldehyde (ALLN), or lactacystin (Fig. 7B). Inducible overexpression of the transcriptional repressor KLF4 in Jurkat cells inhibits the expression of T-cell-associated factors including BCL11B and induces its degradation after 48 h (31). These results prompted us to further investigate the relationship between KLF4 and BCL11B. In Jurkat cells, RT-qPCR analyses detected a strong induction of *KLF4* expression peaking 30 to 60 min after activation (Fig. 7C) and thus preceding the repression of *BCL11B* expression (Fig. 7A). Furthermore, *in silico* analyses of the *BCL11B* promoter identified a conserved KLF4 binding site upstream of the TSS (Fig. 7D). ChIP analyses demonstrated the direct binding of KLF4 on the *BCL11B* promoter and on *CXCR4*, a bona fide KLF4 direct target gene (31) (Fig. 7E) after 5 h of activation when *BCL11B* and *CXCR4* expression are severely repressed (Fig. 7A) (see Fig. S6A and B in the supplemental material).

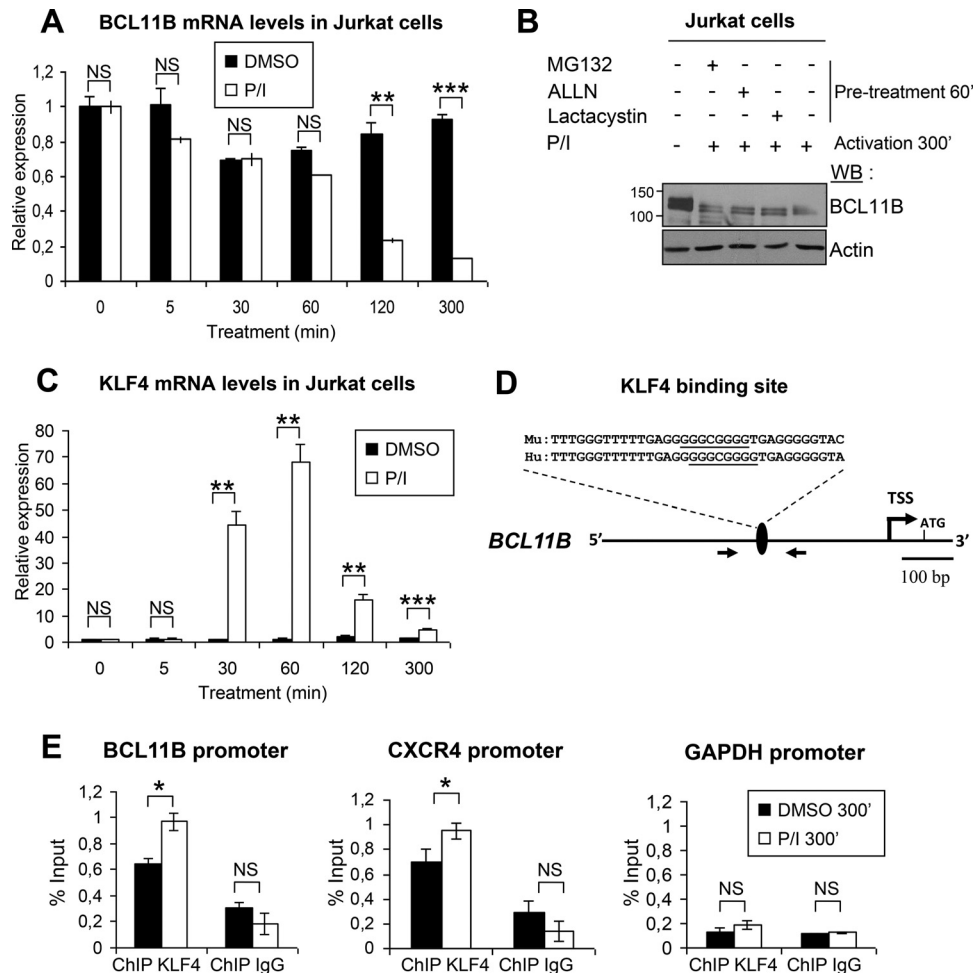
Thus, *BCL11B* is a new direct target gene of the transcriptional repressor KLF4 during human CD4<sup>+</sup> T-cell activation.

**Endogenous BCL11B binds the *IL-2* and *Id2* promoters but with the MTA1 corepressor or the P300 coactivator in resting versus PMA-ionomycin-activated Jurkat T cells.** BCL11B participates through interaction with the P300 coactivator in the transcriptional activation of *IL-2* and of *Id2* (19, 21). Activation of Jurkat cells with P/I induced a huge upregulation of *IL-2* gene expression starting as early as 30 min of treatment and a significant, albeit slightly delayed upregulation of *Id2* around 120 min (Fig. 8A and B; see Fig. S6C in the supplemental material), whereas *BCL11B* mRNA levels decreased after 2 h of treatment (Fig. 7A). Coimmunoprecipitation of BCL11B with MTA1 or P300 endogenous proteins in Jurkat cells treated for 30 min with P/I demonstrated that the peak of BCL11B Ser2 phosphorylation we reproducibly observed (Fig. 6A) is concomitant with a slight decrease of BCL11B-MTA1 interaction and a clear increase of BCL11B-P300 interaction (Fig. 8C).

To correlate these results with promoter occupancy, we first performed pilot ChIP experiments with chromatin prepared from Jurkat cells and showed that BCL11B and MTA1 are bound on upstream site 1 (US1) of the *IL-2* promoter (19) and on the *Id2* promoter on a newly identified and conserved BCL11B binding site located just upstream of the transcription start site (Fig. 8D; also see Fig. S7 in the supplemental material). ChIP experiments conducted with Jurkat cells treated with DMSO or with P/I for 30 min failed to detect any significant differences in BCL11B binding to the *IL-2* and *Id2* promoters (Fig. 8E and F). In contrast, in Jurkat cells activated for 30 min to induce the peak of BCL11B Ser2 phosphorylation (Fig. 6), *IL-2* and *Id2* promoter occupancy by MTA1 and MTA3 was markedly decreased compared to the steady-state levels (Fig. 8E to H). This effect was not due to a downregulation of *MTA1* expression, since the levels of *MTA1* RNAs (see Fig. S6) are slightly increased by the treatment. Conversely and in agreement with the Co-IP experiments, recruitment of the P300 coactivator at the *IL-2* and *Id2* promoters is significantly increased in activated Jurkat cells (Fig. 8I). As a

**FIG 6** Endogenous BCL11B proteins are phosphorylated on Ser2 and SUMOylated in PMA-ionomycin-activated Jurkat cells. (A) Activation of Jurkat cells with PMA-ionomycin (P/I) induces Ser2 phosphorylation of endogenous BCL11B proteins. Jurkat cells were treated with P/I in a time-dependent manner, and cell extracts prepared in denaturing conditions were analyzed by immunoblotting of two different SDS-polyacrylamide gels. In gel A1, the position of pSer2 BCL11B is indicated by a green arrowhead and the position of a nonspecific band is indicated by an asterisk. In gel A2, the positions of slowly migrating BCL11B-SUMOylated species are indicated by red arrowheads. Quantification of total BCL11B proteins in DMSO versus P/I conditions (bottom graph) and of Ser2-phosphorylated and SUMO-BCL11B to BCL11B (right graphs) were performed with Fujifilm MultiGauge software. (B) Detection of pSer2 BCL11B in activated Jurkat cells by IP/WB. Jurkat cells were treated with DMSO or activated for 30 min (30') and pretreated with the phosphatase inhibitor okadaic acid (OA) (+) or not pretreated with OA (-). Total cell extracts were immunoprecipitated by BCL11B and immunoblotted with the pSer2 BCL11B-specific antibodies. The membrane was stripped and reprobed with anti-BCL11B antibodies. The green arrowheads indicate the position of pSer2-BCL11B, and the black arrowheads indicate the supershift of phosphorylated BCL11B observed with OA. (C) The phosphatase inhibitor OA favors detection of pSer2 BCL11B and induces a supershift of BCL11B upon P/I activation of Jurkat cells. Cells were treated with DMSO (-) or activated with P/I for 30 min and pretreated or not with OA. Total cell extracts were prepared and immunoblotted as indicated. The green arrowheads indicate the position of BCL11B, and the black arrowheads indicate the supershift of phosphorylated BCL11B observed with OA. (D) The PKC inhibitor Gö6983 abolishes Ser2 phosphorylation but not the supershift of BCL11B upon P/I activation. An experiment was conducted essentially as described above for panel C but with pretreatment with Gö6983. (E) SUMOylation of endogenous BCL11B proteins is not affected by PKC inhibition. Jurkat cells were treated with DMSO or activated for 60 min to favor SUMOylation and treated with Gö6983 and U0126 or not treated with Gö6983 and U0126. Total cell extracts prepared in denaturing conditions were immunoblotted as indicated. (F) The SUMOylation inhibitor calyculin A inhibits BCL11B SUMOylation. Jurkat cells were treated with DMSO or activated for 60 min and pretreated with the SUMOylation inhibitor calyculin A (Cal A) or not treated with calyculin A. Calyculin A is also a phosphatase inhibitor and thus induces a supershift for BCL11B. The positions of SUMOylated forms of BCL11B are indicated by arrowheads. (G) The specific SUMOylation inhibitor 2-D08 slightly inhibits BCL11B SUMOylation. A similar experiment was performed with Jurkat cells pretreated with 2-D08 or not pretreated with 2-D08 for the indicated times. (H) Detection of endogenous BCL11B SUMOylation in Jurkat cells by immunoprecipitation analyses. Jurkat cells were treated with DMSO or P/I for 1 h to favor SUMOylation. To detect SUMOylated proteins, the cells were lysed in 1 volume of 1% SDS. The lysates were immediately boiled for 10 min, then diluted with 9 volumes of RIPA buffer without SDS, and immunoprecipitated with anti-BCL11B antibodies. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting with anti-SUMO2 (top gels). The position of SUMOylated BCL11B proteins is indicated by an arrowhead. The membranes were stripped and reprobed with anti-BCL11B antibodies. Please note that in contrast with the other gels in this figure, this gel is a 6% SDS-polyacrylamide gel, which might explain the "ladder-like" aspect of the BCL11B bands.





**FIG 7** Activation of Jurkat cells induces BCL11B downregulation by direct transcriptional repression mediated by KLF4. (A) Prolonged activation of Jurkat cells induces downregulation of *BCL11B* expression. Jurkat cells were treated with DMSO or activated with P/I for the indicated times. *BCL11B* mRNAs levels were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analyses. (B) BCL11B proteins are not targeted for degradation by ubiquitination. Jurkat cells were pretreated with different proteasome inhibitors for 1 h before activation and activated for 5 h as indicated. Total cell extracts were immunoblotted with anti-BCL11B antibodies. (C) *KLF4* expression is induced in activated Jurkat cells. *KLF4* mRNA levels were analyzed by RT-qPCR in the samples used in panel A for *BCL11B*. (D) Schematic drawing of the human *BCL11B* proximal promoter region. The transcription start site (TSS), the conserved potential KLF4 binding site (underlined), and the oligonucleotides used in ChIP-qPCR experiments are shown. Mu, murine; Hu, human. (E) KLF4 binds the *BCL11B* promoter. Chromatin was prepared from DMSO-treated and P/I-activated Jurkat cells, and ChIP analyses were performed for KLF4 or IgG at KLF4 binding sites in *BCL11B* and *CXCR4* promoters. *GAPDH* was used as a nonbinding control. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Values that are not statistically significantly different (NS) are also indicated.

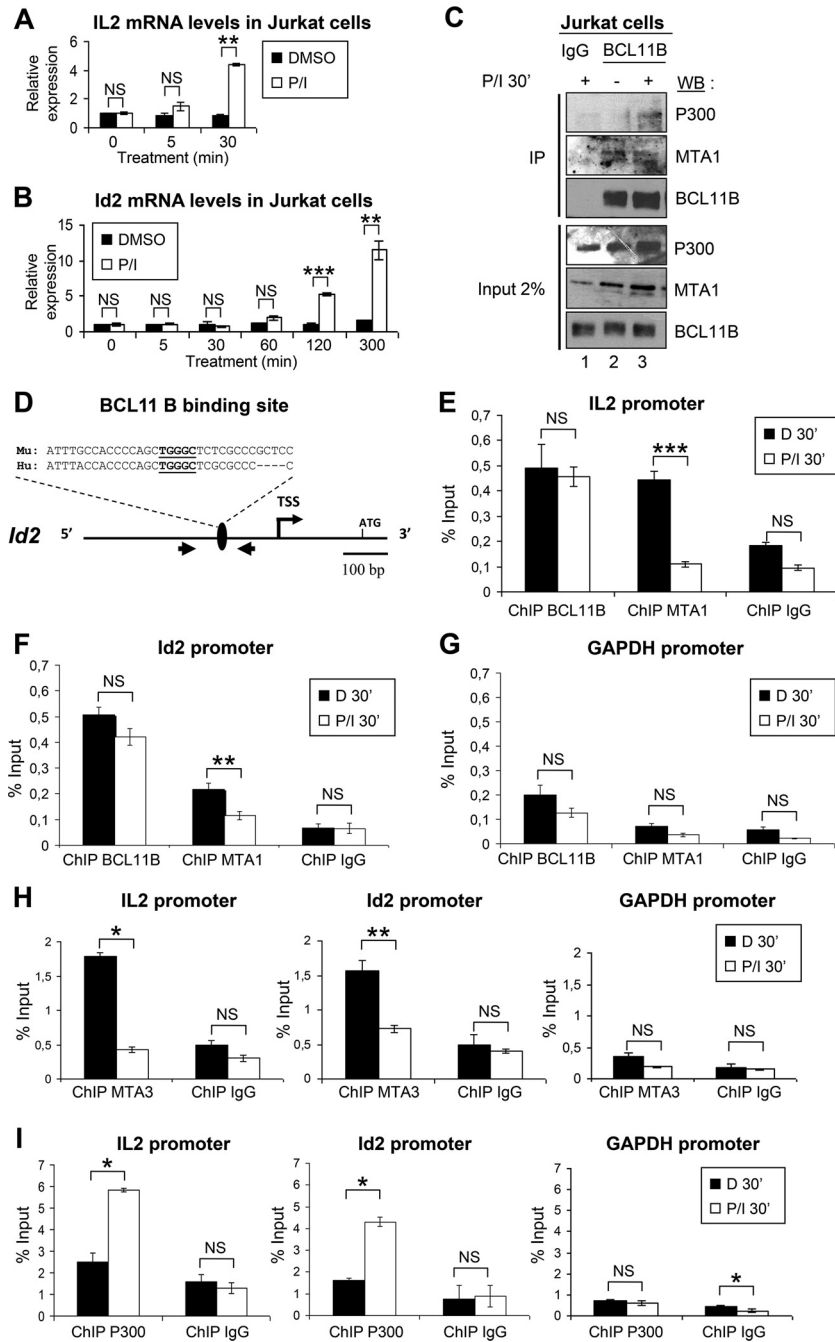
control, none of these proteins were detected on the *GAPDH* promoter (Fig. 8G to I).

Ectopic expression of S2D and S2A BCL11B mutants in Jurkat cells to directly address the impact of Ser2 phosphorylation on this MTA1/P300 switch is not feasible. Indeed, the prior inactivation of the highly expressed endogenous BCL11B proteins will rapidly inhibit the proliferation of Jurkat cells and induce apoptosis (51, 64). To obtain further evidence of the specific involvement of PKC in regulating BCL11B interactions with MTA1 and P300, Jurkat cells were activated in the presence of a pan-PKC inhibitor, Gö6983. Pretreatment of Jurkat cells with Gö6983 has no effect on *BCL11B* or *MTA1* and *RbAp48* expression levels but blocked the P/I-induced activation of *IL-2* expression (Fig. 9A and B) (see Fig. S6G and H in the supplemental material). Furthermore, in the presence of the PKC inhibitor, similar levels of BCL11B are bound to the *IL-2* promoter, but MTA1 and RbAp48 are not released

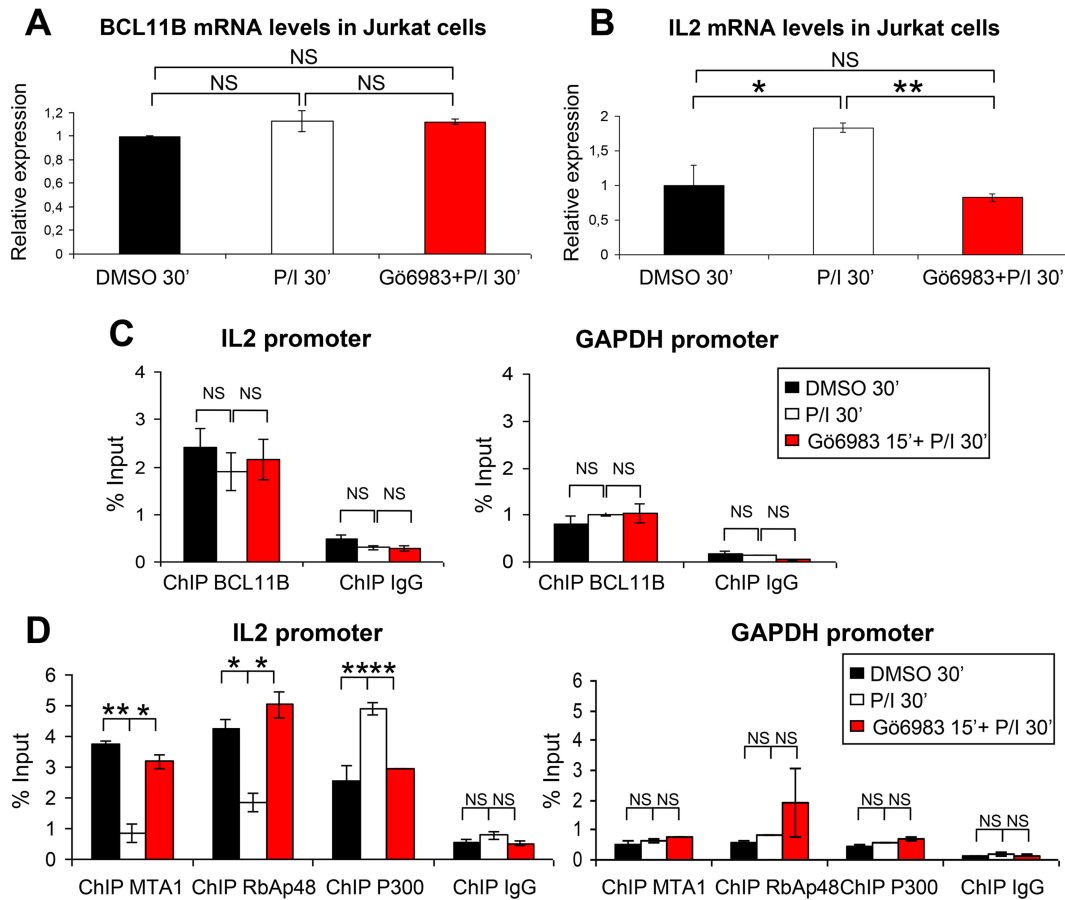
from the promoter (Fig. 9C and D). Conversely, Gö6983 inhibits the P/I-induced increase of P300 binding on the *IL-2* US1 site (Fig. 9D).

Together, these data show that P/I treatment does not affect direct BCL11B binding to *IL-2* and *Id2* promoters but induces its phosphorylation on Ser2 by PKC to disrupt interaction with NuRD repressive complexes and to mediate interaction with P300, thereby participating to its transcriptional activation.

**Activation of primary human CD4<sup>+</sup> T cells switches BCL11B from a transcriptional repressor to a transcriptional activator of *IL-2*.** Primary human CD4<sup>+</sup> T cells were activated with P/I for 5 h or with anti-CD3/CD28 for 24 h to induce TCR stimulation (23). We observed a twofold repression of *BCL11B* mRNA levels under both conditions, whereas BCL11B protein levels were roughly identical, suggesting some posttranslational stabilization mechanisms (Fig. 10A and B). Interestingly, a concomitant increase of



**FIG 8** BCL11B-mediated repression of IL-2 expression through MTA1 or MTA3 recruitment in unstimulated cells is lost during Jurkat cell activation by P/I treatment. (A and B) Activation of human Jurkat CD4<sup>+</sup> T cells by P/I induced an increase of *IL-2* and *Id2* expression. Jurkat cells were treated with DMSO or activated with P/I for the indicated times. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to analyze the increase of *IL-2* (A) and *Id2* (B) expression levels after activation of Jurkat cells. Due to the huge induction of *IL-2* expression after prolonged stimulation, the *IL-2* expression levels measured after 2 and 5 h of treatment are shown with a different scale as Fig. S6C in the supplemental material. (C) Endogenous P300 preferentially interacts with BCL11B in activated Jurkat T cells. Cells were activated with P/I (+) or not activated with P/I (-), lysed in IPH buffer, and immunoprecipitated with anti-BCL11B. As a control, P/I-treated cells were immunoprecipitated with rabbit IgG. The immunoprecipitates were then analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. (D) Schematic drawing of the human *Id2* proximal promoter region with the transcription start site (TSS) and the conserved potential BCL11B direct binding site, TGGGC. The positions of the oligonucleotides used in ChIP-qPCR experiments are shown as arrows. (E to I) ChIP experiments were performed on chromatin from Jurkat cells treated with DMSO (D) or activated with P/I with antibodies against BCL11B, MTA1, MTA3, and rabbit IgG (E to H) or against P300 and mouse IgG (I). The bound material was eluted and analyzed by quantitative PCR using primers flanking the US1 BCL11B binding site in *IL-2* (19) and the newly identified BCL11B binding in *Id2*. For each promoter and antibody, *GAPDH* was used as an internal nonbinding control. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Values that are not statistically significantly different (NS) are also indicated.



**FIG 9** The PKC inhibitor G66983 abolishes the corepressor-coactivator switch of BCL11B on the IL-2 promoter. (A and B) Jurkat cells were treated with DMSO or activated with P/I for 30 min without or with preincubation with the PKC inhibitor G66983. RT-qPCR experiments were performed to analyze the expression levels of *BCL11B* and *IL-2*. (C and D) Relative occupancy of BCL11B, MTA1, RbAp48, and P300 on *IL-2* promoter during Jurkat cell activation with or without treatment with the PKC inhibitor G66983. The level of binding was assessed by ChIP-qPCR experiments in triplicate before and after activation and inhibitor treatment as described for panels A and B. Error bars indicate standard deviations. The ChIP results for the US1 site in the *IL-2* promoter are shown on the left, whereas those for the *GAPDH* promoter used as a nonbinding control are shown on the right. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . Values that are not statistically significantly different (NS) are also indicated.

BCL11B Ser2 phosphorylation and SUMOylation nicely correlating with transcriptional activation of *IL-2* was observed, especially with the anti-CD3/CD28 antibodies (Fig. 10B). ChIP analyses were thus performed after 24-h stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies, a treatment mimicking the canonical activation of T cells through antigen-presenting cells, since *IL-2* induction was particularly efficient (ca. 4,000-fold) under these conditions (Fig. 10C). In these conditions, MTA1, MTA3, and RbAp48 mRNA levels also increased (see Fig. S8 in the supplemental material). This activation had no effect on the binding of BCL11B on the *IL-2* promoter but led to a strongly increased recruitment of P300 to this region, concomitant with the transcriptional activation of *IL-2* (Fig. 10D and E).

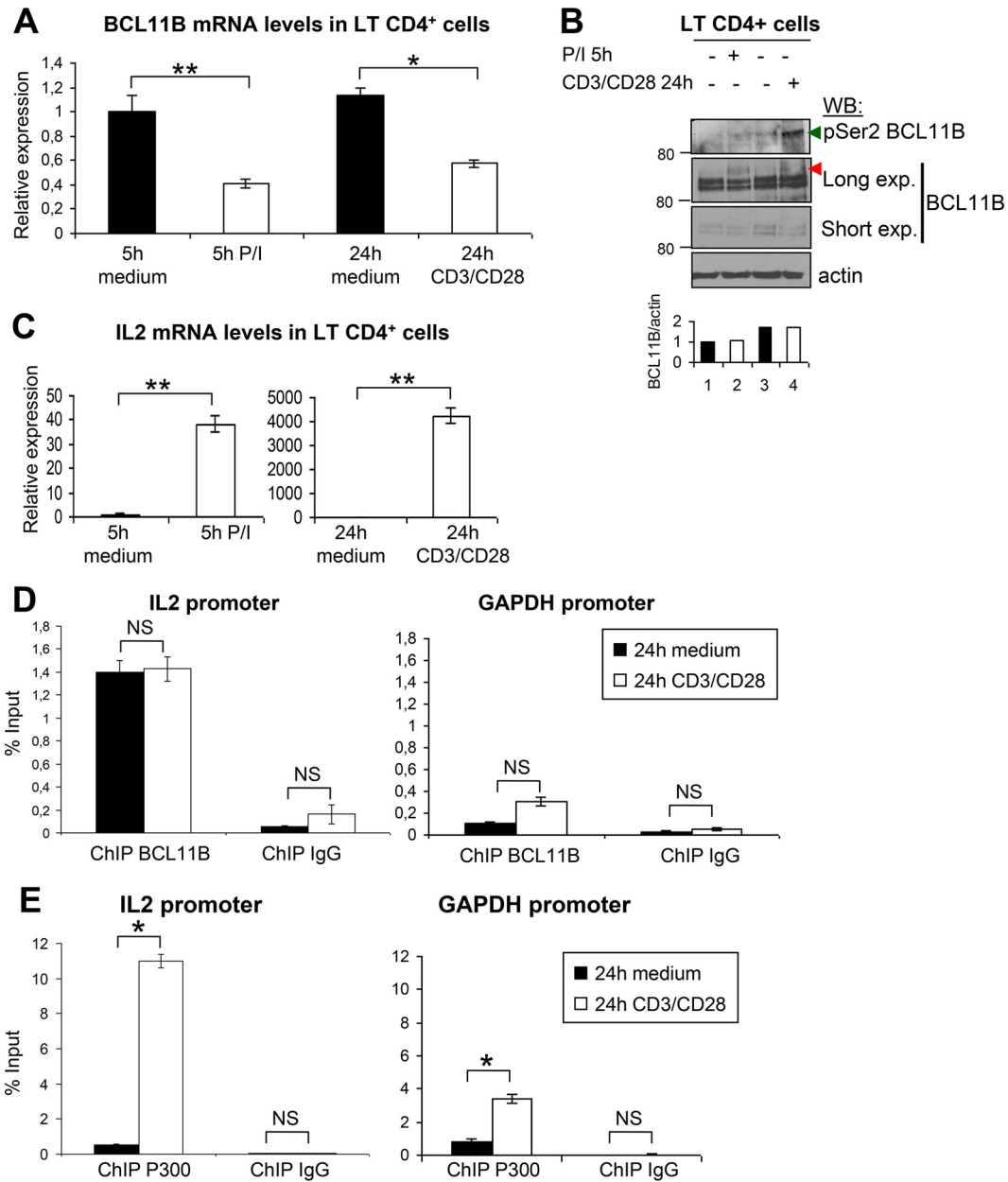
These results therefore show that upon physiological activation of primary human CD4<sup>+</sup> T cells, BCL11B through phosphorylation of Ser2 in its N-terminal repression domain is switched from a transcriptional repressor to an activator of *IL-2* expression.

## DISCUSSION

Multiple posttranslational modifications (PTMs) of a given protein substrate can occur simultaneously or sequentially to modu-

late its function, localization, and stability through cooperative or antagonizing effects on interacting partners. BCL11B is essential for T-cell development. Recently, BCL11B function was shown to be finely regulated during TCR activation of resting murine thymocytes by a MAPK-initiated dynamic sequence of PTMs. Indeed, treatment with phorbol ester and calcium ionophore resulted in rapid phosphorylation on 23 proline-directed serine/threonine kinase (S/TP) sites, deSUMOylation, dephosphorylation, reSUMOylation, ubiquitination, and ultimately degradation of BCL11B (21, 22, 52). Importantly, this complex pathway facilitates derepression of repressed direct target genes of BCL11B, as shown for *Id2*, when immature thymocytes need to initiate differentiation programs (21).

Here, we describe a different and much simpler PKC-mediated pathway which through phosphorylation of Ser2 in the BCL11B conserved MSRKKQ motif participates in the upregulation of *IL-2*, another BCL11B direct target gene, during activation of human CD4<sup>+</sup> T cells by PMA-ionomycin (P/I) or by anti-CD3/CD28 antibodies as a surrogate for canonical activation of T cells through antigen-presenting cells (Fig. 11). Notably, this is the first description at the endogenous level of a PTM targeting this im-



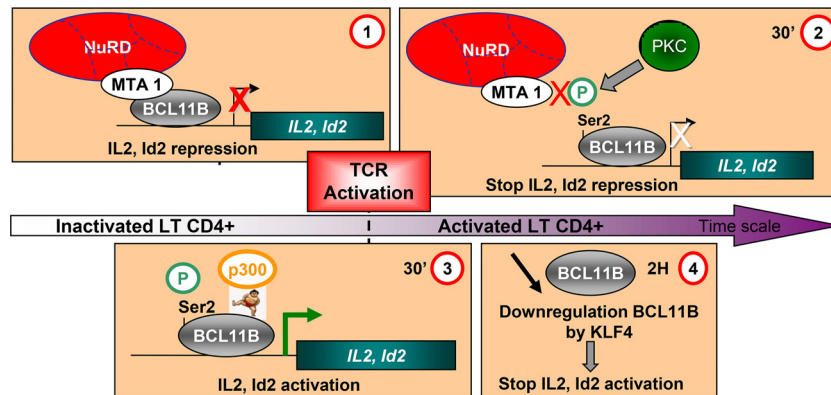
**FIG 10** Activation of primary human CD4<sup>+</sup> T cells induces phosphorylation of BCL11B Ser2 and the corepressor-coactivator switch on the IL-2 promoter. (A) Activation of primary human CD4<sup>+</sup> T cells by P/I or by anti-CD3/CD28 antibodies induced downregulation of *BCL11B* expression. RT-qPCR experiments were performed to analyze *BCL11B* expression. (B) Analyses of endogenous BCL11B phosphorylation on Ser2 and SUMOylation in activated human CD4<sup>+</sup> T cells. CD4<sup>+</sup> T cells were directly lysed in Laemmli buffer, boiled, and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies, 5 h or 24 h after P/I or anti-CD3/CD28 treatment, respectively. The position of SUMOylated BCL11B proteins is indicated by the red arrowhead. (C) Increase of *IL-2* expression in activated human CD4<sup>+</sup> T cells. RT-qPCR experiments were performed to analyze *IL-2* expression upon activation with P/I (left panel) or anti-CD3/CD28 antibodies (right panel). (D and E) Relative occupancy of BCL11B and P300 on the *IL-2* promoter during human CD4<sup>+</sup> T-cell activation. BCL11B (D) and P300 (E) occupancy on the US1 site in the *IL-2* promoter (19) was analyzed by ChIP-qPCR experiments in human CD4<sup>+</sup> T cells with and without activation. Error bars indicate standard deviations. Similar ChIP experiments were performed with control IgG. For each antibody, the ChIP results for the *GAPDH* promoter used as a nonbinding control are shown. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . Values that are not statistically significantly different (NS) are also indicated.

portant MSRRKQ repression motif shared by several distinct nuclear proteins. The phosphorylation of BCL11B Ser2 has not been detected during differentiation of resting murine thymocytes (90% being double-positive [DP] cells) (21), a population clearly distinct from the human CD4<sup>+</sup> T cells analyzed here. However, the N-terminal region was not present in the coverage map of

BCL11B (21) since trypsin digests which cut after Arg and Lys residues are predicted to generate hardly detectable MSR peptides.

The Ser2 phosphorylation peak in Jurkat cells precedes the SUMOylation peak, but a specific PKC inhibitor has no effect on the SUMOylation of BCL11B (Fig. 6). In contrast, the multiple phosphorylation events induced by the MAPK pathway in





**FIG 11** Working model of the corepressor/activator switch on BCL11B target genes during activation of Jurkat cells or primary human CD4<sup>+</sup> T cells. (Step 1) In unstimulated Jurkat or primary human CD4<sup>+</sup> T cells isolated from PBMCs from healthy donors, BCL11B bound with MTA1, and NuRD complex represses transcription of direct target genes such as *IL-2* and *Id2*. (Step 2) Upon activation, phosphorylation of Ser2 in the conserved N-terminal repression domain allows disruption of the interaction with MTA1 and hence NuRD repressive complexes, while BCL11B remains bound to the *IL-2* and *Id2* promoters. (Step 3) Then, SUMOylation on Lys679 in the C-terminal end of BCL11B allows the recruitment of P300 to activate transcription. (Step 4) After 2 to 5 h of treatment, a transcriptional downregulation of *BCL11B* by KLF4 would stop and/or limit the *IL-2* and *Id2* activation.

murine thymocytes favor the interaction of BCL11B with the deSUMOylase SENP1 (21). Another major difference is the lack of ubiquitination of human BCL11B after prolonged P/I treatment of Jurkat cells. In fact, the decrease in BCL11B protein levels observed after 5 h of activation seems to rely mainly on direct transcriptional repression of *BCL11B* by KLF4 rather than on BCL11B protein degradation by the proteasome (Fig. 7).

However, these different MAPK- or PKC-mediated pathways both orchestrate the transcriptional activity of BCL11B to allow derepression of direct target genes, albeit through strikingly different mechanisms. Indeed, by performing quantitative ChIP experiments with activated Jurkat cells or purified normal human CD4<sup>+</sup> T cells, we observed similar levels of binding of BCL11B to the *IL-2* promoter compared to basal conditions. However, in these activating conditions, which result in BCL11B Ser2 phosphorylation, the levels of MTA1 are severely reduced at the *IL-2* promoter, whereas P300 levels reciprocally increase in line with the induction of *IL-2* expression (Fig. 8 to 10). In the Co-IP experiments (Fig. 8C) where a net increase of BCL11B-P300 interaction is clearly seen, the impact of T-cell activation on BCL11B-MTA1 interaction is relatively low. However, in contrast with Co-IPs, the ChIP experiments were performed on chromatin and are thus more likely to reflect the function of a transcription factor and of its different partners in their natural context (53, 54). In developing murine thymocytes, BCL11B and MTA1 remained associated at the *Id2* promoter both in basal conditions and activating conditions, as shown by ChIP experiments (21). However, as stated by these authors, the possibility that MTA1 and/or other NuRD component proteins became posttranslationally modified as a consequence of this treatment has not been investigated in detail. This is an important issue since the C-terminal end of MTA proteins involved in the interaction with MSRRKQ proteins is subject to extensive posttranslational modifications. Notably, the methylation-demethylation of MTA1 lysine 532 regulates its cyclical and signaling-dependent association with NuRD corepressor or nucleosome remodeling factor (NuRF) coactivator complexes, respectively (55). The transcriptional cofactor FOG1 (friend of GATA) also interacts with NuRD through a N-terminal MSRRKQ motif, and this interaction plays a key role for lineage

commitment during erythropoiesis and megakaryopoiesis (45, 56, 57). Strikingly, ChIP experiments revealed that NuRD components are present at both repressed and active GATA1/FOG1 target genes (58). These results suggest two possible mechanisms for interaction of MTA1 with different transcription factors depending on the cellular context: (i) binding of MTA1 to the target genes both in active or repressive conditions but with PTMs fine-tuning its interaction with repressive or activating complexes as reported for GATA1/FOG1 or (ii) present only in repressive conditions and loss of interaction in activating conditions due to specific PTMs in short MTA1-interacting motifs, as shown here for PKC-mediated phosphorylation of BCL11B in CD4<sup>+</sup> T cells.

Here, we demonstrated that this short motif is necessary and sufficient to mediate binding of BCL11A and BCL11B to the three members of the MTA corepressor family, thus enabling BCL11A, BCL11B, and more generally MSRRKQ-containing proteins to interact with the complete range of NuRD complexes. This highlights their flexibility to participate in various differentiation programs involved in the development of the immune and central nervous systems and to regulate tissue-specific gene expression in many distinct cellular types including T and B cells, ameloblasts or keratinocytes for BCL11B (16), or lymphopoiesis and erythroid precursors for BCL11A (15). Interestingly, the interaction of the BTB/POZ transcriptional repressors HIC1 and BCL6 with MTA1 and MTA3, respectively, are inhibited by acetylation of a lysine residue in different conserved peptidic interaction motifs. HIC1 acetylation on K314 in the MKHEP SUMOylation/acetylation motif negatively regulates its interaction with MTA1, whereas its SUMOylation favors it, notably in the DNA damage response (40, 59). BCL6 acetylation on K379 in the KKYK motif abrogates its ability to interact with MTA3, which is a major repression mechanism controlling germinal center B-cell differentiation (60–62) as well as CD4<sup>+</sup> T-cell fate and function (63).

Although our studies have been focused on BCL11B, it is tempting to speculate that similar PTMs could be identified in other MSRRKQ-containing nuclear proteins. Indeed, the developmental regulator SALL1 is certainly regulated by PKC phosphorylation on Ser2, as suggested by *in vitro* studies (27). For FOG1, the role of Ser2 has been investigated only through alanine

scanning experiments which demonstrated that this S2A mutation did not affect the repression potential of a FOG1 1-12-Gal4 chimera (56). However, these *in vitro* studies or *in vivo* knock-in models in mice and the crystal structure of RbAp48 (another NuRD component) bound to the 15 N-terminal amino acids of FOG1 have provided compelling pieces of evidence for the key role played by the RKK residues in the conserved MSRRKQ motif (45, 56–58). Whereas Ser2 is involved only in hydrogen bond interaction, these RKK residues are engaged both in hydrogen bond interaction and in ion pair contacts with acidic Glu residues in RbAp48 (49). These strong interactions could be impaired by the negative charge brought by PKC-mediated phosphorylation of the adjacent Ser2 residue as shown for the interaction between the phosphomimetic S2D BCL11B mutant and the related RbAp46 protein (Fig. 3E). Recently, ZNF827 was shown to recruit NuRD to telomeres in cells using alternative lengthening of telomeres (ALT) to enable telomere extension. This recruitment relies on RKK residues found in an N-terminal MPRRKQ motif highly homologous to the motif found in FOG, SALL1, and BCL11A/B except for the replacement of Ser2 by a Pro residue (65). Thus, the PKC-mediated phosphorylation of Ser2 that we have demonstrated here for BCL11B would provide to these MSRRKQ-containing proteins a rapid and efficient mechanism to fine tune their interaction via a RKK motif with NuRD.

In conclusion, we have identified a novel mechanism for how the essential regulator of T-cell development BCL11B is regulated by PKC-mediated phosphorylation of Ser2 in its conserved N-terminal repression domain during activation of CD4<sup>+</sup> T cells. In addition, this BCL11B N-terminal domain is essential for the transcriptional repression of HIV-1 long terminal repeat (LTR) sequences which thus affects both HIV-1 replication and virus production in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (66). In future studies, it would be interesting to explore whether this switch between transcriptional repression and activation by phosphorylation in their MSRRKQ motifs could be generalized to other NuRD-interacting proteins, in particular to BCL11A or FOG1, two important regulators of differentiation programs during normal hematopoiesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

Marion Dubuissez and Sonia Paget are supported by predoctoral fellowships from the University of Lille.

We thank Capucine Van Rechem for critically reading the manuscript.

## FUNDING INFORMATION

This work, including the efforts of Dominique Leprince, was funded by Ligue Contre le Cancer Comité du Pas de Calais. This work, including the efforts of Anne Tsicopoulos, was funded by Santélys. This work, including the efforts of Dominique Leprince, was funded by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

## REFERENCES

- Avram D, Fields A, Pretty On Top K, Nevrivy DJ, Ishmael JE, 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.14.10315>.
- Avram D, Fields A, Senawong T, Topark-Ngarm A, 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. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20020496>.
- Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T, Mishima Y, Niwa O, Kominami R. 2003. Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* 301:598–603. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)03069-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)03069-3).
- Avram D, Califano D. 2014. The multifaceted roles of Bcl11b in thymic and peripheral T cells: impact on immune diseases. *J Immunol* 193:2059–2065. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1400930>.
- Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S, Kominami R. 2003. Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nat Immunol* 4:533–539. <http://dx.doi.org/10.1038/ni927>.
- Albu DI, Feng D, Bhattacharya D, Jenkins NA, Copeland NG, Liu P, Avram D. 2007. BCL11B is required for positive selection and survival of double-positive thymocytes. *J Exp Med* 204:3003–3015. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20070863>.
- Li L, Leid M, Rothenberg EV. 2010. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* 329:89–93. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1188989>.
- Li P, Burke S, Wang J, Chen X, Ortiz M, Lee SC, Lu D, Campos L, Goulding D, Ng BL, Dougan G, Huntly B, Gottgens B, Jenkins NA, Copeland NG, Colucci F, Liu P. 2010. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* 329:85–89. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1188063>.
- Kastner P, Chan S, Vogel WK, Zhang LJ, Topark-Ngarm A, Golonzhka O, Jost B, Le Gras S, Gross MK, Leid M. 2010. Bcl11b represses a mature T-cell gene expression program in immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Eur J Immunol* 40:2143–2154. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940258>.
- Gutierrez A, Kentsis A, Sanda T, Holmfeldt L, Chen SC, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Dahlberg SE, Neuberg DS, Silverman LB, Winter SS, Hunger SP, Sallan SE, Zha S, Alt FW, Downing JR, Mullighan CG, Look AT. 2011. The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118:4169–4173. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-11-318873>.
- Kominami R. 2012. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88:72–87. <http://dx.doi.org/10.2183/pjab.88.72>.
- Di Santo JP. 2010. Immunology. A guardian of T cell fate. *Science* 329:44–45. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1191664>.
- Liu P, Keller JR, Ortiz M, Tessarollo L, Rachel RA, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG. 2003. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4:525–532. <http://dx.doi.org/10.1038/ni925>.
- Sankaran VG, Xu J, Ragoczy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, Fujiwara Y, Ito M, Groudine M, Bender MA, Tucker PW, Orkin SH. 2009. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 460:1093–1097. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08243>.
- Bauer DE, Kamran SC, Orkin SH. 2012. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders. *Blood* 120:2945–2953. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-06-292078>.
- Le Douce V, Cherrier T, Riclet R, Rohr O, Schwartz C. 2014. The many lives of CTIP2: from AIDS to cancer and cardiac hypertrophy. *J Cell Physiol* 229:533–537. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24490>.
- Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, Aunis D, Rohr O. 2007. Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 26:412–423. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601516>.
- Cismasiu VB, Adamo K, Gecewicz J, Duque J, Lin Q, Avram D. 2005. BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* 24:6753–6764. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208904>.
- Cismasiu VB, Ghanta S, Duque J, Albu DI, Chen HM, Kasturi R, Avram D. 2006. BCL11B participates in the activation of IL2 gene expression in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Blood* 108:2695–2702. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-05-021790>.
- Cismasiu VB, Duque J, Paskaleva E, Califano D, Ghanta S, Young HA, 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. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20080925>.
- Zhang LJ, Vogel WK, Liu X, Topark-Ngarm A, Arbogast BL, Maier CS, Filtz TM, Leid M. 2012. 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.344176>.
22. Filtz TM, Vogel WK, Leid M. 2014. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci* 35:76–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.11.005>.
  23. Azzaoui I, Yahia SA, Chang Y, Vorng H, Morales O, Fan Y, Delhem N, Ple C, Tonnel AB, Wallaert B, Tscopoulos A. 2011. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood* 118:3549–3558. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-02-338780>.
  24. Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, Dequiedt F, Goumon Y, Paillart JC, Mericskay M, Parlakian A, Bausero P, Abbas W, Herbein G, Kurdستاني SK, Grana X, Van Driessche B, Schwartz C, Cardolfi E, Benecke AG, Van Lint C, Rohr O. 2013. CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12655–12660. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1220136110>.
  25. Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C, Dejean A, Leprince D. 2007. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27:2661–2675. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01098-06>.
  26. Laubert SM, Rauchman M. 2006. A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem* 281:23922–23931. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M513461200>.
  27. Laubert SM, Bilyeu AC, Firulli BA, Kroll KL, 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M703702200>.
  28. Chen L, Meng Q, Jing X, Xu P, Luo D. 2011. A role for protein kinase C in the regulation of membrane fluidity and Ca(2+)(+) flux at the endoplasmic reticulum and plasma membranes of HEK293 and Jurkat cells. *Cell Signal* 23:497–505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.11.005>.
  29. Prickett TD, Brautigan DL. 2006. The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 and PP2A. *J Biol Chem* 281:30503–30511. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M601054200>.
  30. Muller S, Matunis MJ, Dejean A. 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17:61–70. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.1.61>.
  31. Li W, Jiang Z, Li T, Wei X, Zheng Y, Wu D, Yang Y, Chen S, Xu B, Zhong M, Jiang J, Hu Y, Su H, Zhang M, Huang X, Geng S, Weng J, Du X, Liu P, Li Y, Liu H, Yao Y, Li P. 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. <http://dx.doi.org/10.1186/s12943-014-0285-x>.
  32. Kim YS, Nagy K, Keyser S, Schneekloth SJ, Jr. 2013. An electrophoretic mobility shift assay identifies a mechanistically unique inhibitor of protein sumoylation. *Chem Biol* 20:604–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.001>.
  33. Fukuda I, Ito A, Hirai G, Nishimura S, Kawasaki H, Saitoh H, Kimura K, Sodeoka M, Yoshida M. 2009. Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate. *Chem Biol* 16:133–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.009>.
  34. Hoellein A, Fallahi M, Schoeffmann S, Steidle S, Schaub FX, Rudelius M, Laitinen I, Nilsson L, Goga A, Peschel C, Nilsson JA, Cleveland JL, Keller U. 2014. Myc-induced SUMOylation is a therapeutic vulnerability for B-cell lymphoma. *Blood* 124:2081–2090. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-06-584524>.
  35. Hemshekhar M, Sebastin Santhosh M, Kemparaju K, Girish KS. 2012. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110:122–132. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>.
  36. Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.320234>.
  37. Wu CS, Ouyang J, Mori E, Nguyen HD, Marechal A, Hallet A, Chen DJ, Zou L. 2014. SUMOylation of ATRIP potentiates DNA damage signaling by boosting multiple protein interactions in the ATR pathway. *Genes Dev* 28:1472–1484. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.238535.114>.
  38. Van Dessel N, Beke L, Gornemann J, Minnebo N, Beullens M, Tanuma N, Shima H, Van Eynde A, Bollen M. 2010. The phosphatase interactor NIPPI1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets. *Nucleic Acids Res* 38:7500–7512. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq643>.
  39. Boulay G, Rosnoble C, Guerardel C, Angrand PO, 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. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20100944>.
  40. Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C, Leprince D. 2013. DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *J Biol Chem* 288:10254–10264. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.421610>.
  41. Dege C, Hagman J. 2014. Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and T-lymphocyte development and function. *Immunol Rev* 261:126–140. <http://dx.doi.org/10.1111/immr.12209>.
  42. Manavathi B, Singh K, Kumar R. 2007. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nucl Recept Signal* 5:e010. <http://dx.doi.org/10.1621/nrs.05010>.
  43. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D, Schlegelberger B, Oscier DG, Siebert R, Tucker PW, Dyer MJ. 2001. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 98:3413–3420. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.12.3413>.
  44. Durum SK. 2003. Bcl11: sibling rivalry in lymphoid development. *Nat Immunol* 4:512–514. <http://dx.doi.org/10.1038/ni0603-512>.
  45. Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C, Blobel GA. 2005. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J* 24:2367–2378. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600703>.
  46. Alqarni SS, Murthy A, Zhang W, Przewlorka MR, Silva AP, Watson AA, Lejon S, Pei XY, Smits AH, Kloet SL, Wang H, Shepherd NE, Stokes PH, Blobel GA, Vermeulen M, Glover DM, Mackay JP, Laue ED. 2014. Insight into the architecture of the NuRD complex: structure of the RbAp48-MTA1 subcomplex. *J Biol Chem* 289:21844–21855. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.558940>.
  47. Kennelly PJ, Krebs EG. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266:15555–15558.
  48. Kong KF, Altman A. 2013. In and out of the bull's eye: protein kinase Cs in the immunological synapse. *Trends Immunol* 34:234–242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.01.002>.
  49. Lejon S, Thong SY, Murthy A, AlQarni S, Murzina NV, Blobel GA, Laue ED, Mackay JP. 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.195842>.
  50. Puente LG, Stone JC, Ostergaard HL. 2000. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinase in T cells: potential role of additional diacylglycerol binding protein. *J Immunol* 165:6865–6871. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.6865>.
  51. Huang X, Shen Q, Chen S, Chen S, Yang L, Weng J, Du X, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. 2011. Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. *J Hematol Oncol* 4:23. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-4-23>.
  52. Vogel WK, Gafken PR, Leid M, Filtz TM. 2014. Kinetic analysis of BCL11B multisite phosphorylation-dephosphorylation and coupled sumoylation in primary thymocytes by multiple reaction monitoring mass spectroscopy. *J Proteome Res* 13:5860–5868. <http://dx.doi.org/10.1021/pr5007697>.
  53. Li X, Wang W, Wang J, Malovannaya A, Xi Y, Li W, Guerra R, Hawke DH, Qin J, Chen J. 2015. Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol Syst Biol* 11:775. <http://dx.doi.org/10.15252/msb.20145504>.
  54. Ji Z, Sharrocks AD. 2015. Changing partners: transcription factors form different complexes on and off chromatin. *Mol Syst Biol* 11:782. <http://dx.doi.org/10.15252/msb.20145936>.
  55. Nair SS, Li DQ, Kumar R. 2013. A core chromatin remodeling factor instructs global chromatin signaling through multivalent reading of nucleosome codes. *Mol Cell* 49:704–718. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.016>.
  56. Lin AC, Roche AE, Wilk J, Svensson EC. 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. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411240200>.
57. Gao Z, Huang Z, Olivey HE, Gurbuxani S, Crispino JD, Svensson EC. 2010. FOG-1-mediated recruitment of NuRD is required for cell lineage re-enforcement during haematopoiesis. *EMBO J* 29:457–468. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.368>.
  58. Miccio A, Wang Y, Hong W, Gregory GD, Wang H, Yu X, Choi JK, Shelat S, Tong W, Poncz M, Blobel GA. 2010. NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J* 29:442–456. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.336>.
  59. Van Rechem C, Boulay G, Pinte S, Stankovic-Valentin N, Guerardel C, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00582-09>.
  60. Fujita N, Jaye DL, Geigerman C, Akyildiz A, Mooney MR, Boss JM, Wade PA. 2004. MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* 119:75–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.014>.
  61. Huang C, Gonzalez DG, Cote CM, Jiang Y, Hatzi K, Teater M, Dai K, Hla T, Haberman AM, Melnick A. 2014. The BCL6 RD2 domain governs commitment of activated B cells to form germinal centers. *Cell Rep* 8:1497–1508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.059>.
  62. Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, Juszczynski P, Lev P, Ranuncolo SM, Yin Y, Klein U, Cattoretti G, Dalla Favera R, Shipp MA, Melnick A. 2007. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* 110:2067–2074. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-01-069575>.
  63. Nance JP, Belanger S, Johnston RJ, Hu JK, Takemori T, Crotty S. 2015. Bcl6 middle domain repressor function is required for T follicular helper cell differentiation and utilizes the corepressor MTA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13324–13329. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1507312112>.
  64. Huang X, Chen S, Shen Q, Chen S, Yang L, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. 2011. Down regulation of BCL11B expression inhibits proliferation and induces apoptosis in malignant T cells by BCL11B-935-siRNA. *Hematology* 16:236–242. <http://dx.doi.org/10.1179/102453311X13025568941961>.
  65. Conomos D, Reddel RR, Pickett HA. 2014. NuRD-ZNF827 recruitment to telomeres creates a molecular scaffold for homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 21:760–770. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2877>.
  66. Cismasiu VB, Paskaleva E, Suman Daya S, Canki M, Duus K, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.035>.

# HIC1 (hypermethylated in cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair but is essential for the apoptotic DNA damage response (DDR) to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs)

Sonia Paget<sup>1</sup>, Marion Dubuissez<sup>1,4</sup>, Vanessa Dehennaut<sup>1</sup>, Joe Nassour<sup>1,5</sup>, Brennan T. Harmon<sup>2</sup>, Nathalie Spruyt<sup>1</sup>, Ingrid Loison<sup>1</sup>, Corinne Abbadie<sup>1</sup>, Brian R. Rood<sup>3</sup>, Dominique Leprince<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161-M3T-Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, Lille, France

<sup>2</sup>Genomics Core, Children's National Medical Center, Washington DC, USA

<sup>3</sup>Center for Cancer and Immunology Research, Children's National Medical Center, Washington DC, USA

<sup>4</sup>Present Address: Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Boulevard l'Assomption Montreal, Canada

<sup>5</sup>Present Address: The Salk Institute for Biological Studies, Molecular and Cell Biology Department, La Jolla, California, USA

**Correspondence to:** Dominique Leprince, **email:** dominique.leprince@ibl.cnrs.fr

**Keywords:** DNA damage response, HIC1, ATM, MTA1, SUMOylation

**Received:** June 14, 2016

**Accepted:** November 23, 2016

**Published:** December 07, 2016

## ABSTRACT

The tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated In Cancer 1*) encodes a transcriptional repressor mediating the p53-dependent apoptotic response to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs) through direct transcriptional repression of *SIRT1*. *HIC1* is also essential for DSB repair as silencing of endogenous *HIC1* in BJ-hTERT fibroblasts significantly delays DNA repair in functional Comet assays. *HIC1* SUMOylation favours its interaction with MTA1, a component of NuRD complexes. In contrast with irreparable DSBs induced by 16-hours of etoposide treatment, we show that repairable DSBs induced by 1 h etoposide treatment do not increase *HIC1* SUMOylation or its interaction with MTA1. Furthermore, *HIC1* SUMOylation is dispensable for DNA repair since the non-SUMOylatable E316A mutant is as efficient as wt *HIC1* in Comet assays. Upon induction of irreparable DSBs, the ATM-mediated increase of *HIC1* SUMOylation is independent of its effector kinase Chk2. Moreover, irreparable DSBs strongly increase both the interaction of *HIC1* with MTA1 and MTA3 and their binding to the *SIRT1* promoter. To characterize the molecular mechanisms sustained by this increased repression potential, we established global expression profiles of BJ-hTERT fibroblasts transfected with *HIC1*-siRNA or control siRNA and treated or not with etoposide. We identified 475 genes potentially repressed by *HIC1* with cell death and cell cycle as the main cellular functions identified by pathway analysis. Among them, *CXCL12*, *EPHA4*, *TGFBR3* and *TRIB2*, also known as MTA1 target-genes, were validated by qRT-PCR analyses. Thus, our data demonstrate that *HIC1* SUMOylation is important for the transcriptional response to non-reparable DSBs but dispensable for DNA repair.

## INTRODUCTION

The genomic integrity of all living organisms is constantly challenged by deleterious attacks due to endogenous or exogenous genotoxic stress. DNA damage and in particular DNA double-strand breaks (DSBs) are highly deleterious since they can be lethal if unrepaired

or predispose to oncogenic transformation if misrepaired. To cope with these lesions, cells have developed multiple interacting pathways called the DNA damage response (DDR) that lead either to damage repair or to programmed cell death depending on the extent of the damage [1]. A multi-branched, highly coordinated signaling cascade of Post-Translational Modifications (PTM) allows the

effective recruitment, stabilization and retention at DSBs of numerous proteins including sensors, mediators and effectors of the DDR [2]. A major transducer of DNA damage signaling in the case of DSBs is the activation of the PIKKs (Phosphatidylinositol 3 kinase-like protein kinase) ATM or DNA-PKcs proteins. In particular, the apical ATM kinase phosphorylates hundreds of proteins including histones (H2AX), repair factors (BRCA1), its effector kinase (CHK2) or transcription factors such as P53 [3]. Previous studies demonstrated that together with P53, SIRT1 and the tumor suppressor gene *HIC1* (*Hypermethylated in cancer 1*), which is epigenetically silenced by promoter hypermethylation in many types of human cancers [4, 5], plays a critical role in the DNA damage response [6–8]. Indeed, *HIC1* is a direct target-gene of P53 and upon induction of irreparable DSBs, HIC1 regulates the p53-dependant apoptotic DNA damage response [6]. When treated overnight with etoposide, a DSB inducer, wt Murine Embryo Fibroblasts (MEFs) rapidly begin to die whereas *Hic1*<sup>-/-</sup> MEFs are resistant to apoptosis. Conversely, re-expression of HIC1 in MCF-7 cells through adenoviral infection restores their sensitivity to P53-induced apoptosis [6]. This effect relies mainly on the HIC1-mediated direct transcriptional repression of *SIRT1*, which deacetylates and inactivates P53 allowing cells to by-pass P53 induced apoptosis and survive DNA damage [6]. Recently, we have shown that HIC1 is also a key player in the response to repairable DNA damage. Down-regulation of endogenous *HIC1* expression through RNA interference in normal human fibroblasts treated for 1 hour with Etoposide delays DNA repair, as shown by functional comet assays [8].

*HIC1* encodes a transcriptional repressor containing an N-terminal BTB domain and five C-terminal C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Krüppel-like Zinc fingers [9]. We have shown that HIC1 interacts with 4 major co-repressors complexes involved in chromatin remodelling and epigenetic regulation; CtBP, SWI/SNF, NuRD and the *Polycomb* PRC2 complex [9]. In particular, we have demonstrated through yeast two-hybrid screening and various biochemical approaches that HIC1 interacts with the C-terminal region of MTA1, a core component of NuRD, through a SUMOylation consensus motif in the HIC1 central region [10, 11]. SUMOylation is a highly dynamic and labile PTM that plays a key role in the assembly of multi-protein complexes [12]. The HIC1-MTA1 interaction is regulated by two mutually exclusive PTM of Lysine 314, promotion by SUMOylation and inhibition by acetylation [10, 11]. Previously, we demonstrated that irreparable DSBs induced by a 16 h treatment with etoposide result in a specific increase of HIC1 SUMOylation in an ATM-dependant manner [8]. This increase of HIC1 SUMOylation is correlated with an increased interaction of endogenous HIC1 and MTA1 proteins in etoposide

treated normal human fibroblasts, thereby favouring the recruitment of NuRD repressive complexes onto HIC1 target genes [8]. This provides the first mechanism by which the transcriptional repression function of HIC1 is activated upon DNA damage.

In this study, we further investigated the function and regulation of HIC1 SUMOylation during the DNA damage response to repairable and non-repairable DSBs. First, we demonstrate that HIC1 SUMOylation does not increase upon induction of repairable DSBs by a 1 h etoposide treatment. In addition, results from functional DNA repair assays such as Comet assays using overexpression of wt or non-SUMOylatable (E316A) HIC1 in Cos-7 cells that do not express endogenous HIC1 demonstrated that SUMOylation on Lysine 314 is not implicated in DSB repair. Indeed, the efficiency and kinetics of repair exhibited by the E316A point mutant and wild-type HIC1 are virtually indistinguishable. Furthermore, we show that the increased SUMOylation of HIC1 in the presence of irreparable DSBs induced by a 16 hours etoposide treatment is primarily dependent on ATM which is stabilized and activated on chromatin but independent of its nucleoplasmic effector kinase CHK2. As for the HIC1-MTA1 interaction, we showed that it depends on a non-covalent interaction between SUMOylated HIC1 and the SUMO-interacting motif (SIM) in the C-terminal part of MTA1. Furthermore, we demonstrated that HIC1 also interacts with the related corepressor MTA3 and that irreparable DSBs increase this interaction, as shown for MTA1. By ChIP experiments, we showed that induction of irreparable DSBs results in an increased recruitment of MTA1, MTA3 and also of HIC1 onto HIC1-response elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter. To further characterize the molecular mechanisms sustained by this increased repression potential, we established global expression profiles of BJ-hTERT fibroblasts transfected with HIC1-siRNA or control siRNA and treated or not with etoposide. We identified 475 genes potentially repressed by HIC1 with cell death and cell cycle as the main cellular functions identified by pathway analysis. Cross referencing this list with the 1024 MTA1 target genes identified by comparing wt MEFs (Murine Embryo Fibroblasts) with *Mta1*<sup>-/-</sup> MEFs identified 17 common genes. Among them, *CXCL12*, *EPHA4*, *LPHN2*, *TGFβR3* and *TRIB2* were shown to be activated in siHIC1 fibroblasts and to be more repressed in control cells treated with Etoposide to increase HIC1 SUMOylation.

In summary, our results demonstrate that HIC1 SUMOylation is dispensable for DNA repair but is important for the p53-dependent apoptotic transcriptional response to irreparable DSBs, notably through the recruitment of MTA1 or MTA3 containing NuRD repressive complexes to the *SIRT1* promoter and other potential direct target genes.

## RESULTS

### Repairable DNA DSBs do not result in a PIKK-dependant increase of HIC1 SUMOylation and interaction with MTA1

We previously demonstrated that induction of non-repairable DSBs by overnight (16 h) treatment of transfected HEK293T cells with 20  $\mu$ M etoposide, an inhibitor of topoisomerase II known to induce DSBs, results in a significant increase of HIC1 SUMOylation [8]. Such a prolonged assault leads to the accumulation of non-repairable damage resulting in a p53-dependent apoptotic response [6]. HEK293T cells were transfected with the empty FLAG or FLAG-HIC1 expression vectors with or without an expression vector for His-SUMO2 and/or the de-SUMOylase SENP2. 48 hours after transfection, cells were treated with 20  $\mu$ M etoposide for 16 hours to induce non-repairable DNA damage and immediately lysed under denaturing conditions. Total extracts were then analyzed by Western blot with anti-FLAG monoclonal antibodies to detect HIC1 and its SUMOylated forms. As shown in Figure 1A, the isoform of higher molecular weight, corresponding to the SUMOylated form of HIC1, disappeared in presence of SENP2 and is significantly increased after 16 h etoposide treatment, as previously shown [8].

Since endogenous HIC1 also activates the kinetics and/or efficiency of DSB repair in BJ-hTERT fibroblasts, we next wanted to address the importance of HIC1 SUMOylation in the repair process [8]. In striking contrast with the ATM-dependent increase of HIC1 SUMOylation observed in HEK293T cells treated for 16 hours with etoposide [8], HIC1 SUMOylation levels do not increase after the induction of repairable DSBs by a short (1 hour) etoposide treatment (Figure 1B, compare lanes 3 and 4 to lanes 7 and 8). This HIC1 SUMOylation is also independent of ATM activation since its level remains constant when cells are pre-incubated for 1 h with the specific ATM inhibitor Ku-55939 prior to the 1 hour etoposide treatment (Supplementary Figure S1A).

DNA-damaging agents that create DSBs activate a DDR primarily relying on the activation of kinases of the PIKKs (Phosphatidylinositol 3 kinase-like protein kinase) family, ATM or DNA-PKcs proteins [13]. After induction of repairable damage, inhibition of ATM and DNA-PKcs by Wortmaninn, a PI3K inhibitor also inhibiting PIKKs, or by pharmacological inhibitors specific for each PIKK, has no significant effects on HIC1 SUMOylation (Figure 1C). Previously, we demonstrated that SUMOylation potentiates the repressive potential of HIC1 by favoring its interaction with MTA1 [10, 11], most notably during the response to non-repairable DSBs [8]. However, after induction of repairable DSBs, co-immunoprecipitation experiments in HEK293T cells transfected with expression vectors for HIC1 and MTA1

clearly failed to demonstrate a stronger interaction between these two proteins (Figure 1D).

In conclusion, repairable and non-repairable DSBs, induced by 1 hour or 16 hours etoposide treatments respectively, have different impacts on HIC1 SUMOylation and hence on the interaction between HIC1 and the NuRD complex, potentially in line with the biological outcomes of the DNA damage responses to these different genotoxic insults, repair or apoptosis.

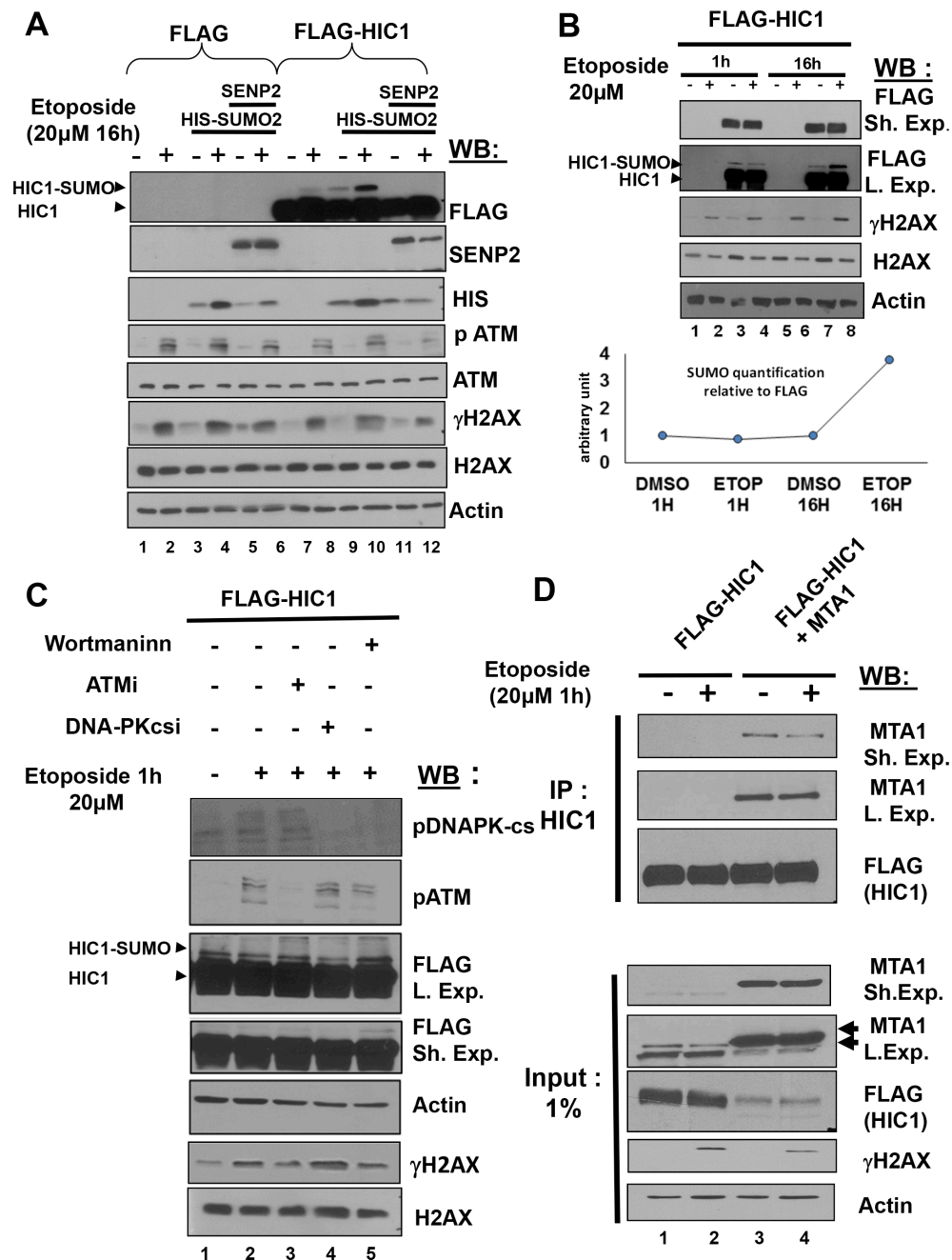
### Lack of HIC1 SUMOylation does not impair DNA repair

To address the functional impact of HIC1 SUMOylation on the time-course of DSBs repair, we first tested wt HIC1 and the empty FLAG expression vector in the neutral Comet assay which specifically measured DSBs at the level of individual cells. To that end, 48 hours after transfection, Cos7 cells which do not express HIC1 at significant endogenous levels were treated for 1 hour with etoposide before recovery in complete culture medium without etoposide for various times. As shown in Figure 2A, ectopic expression of HIC1 slightly accelerates DSBs repair notably during the early steps of recovery (2 h and 4 h). These observations are in close agreement with the slower repair induced in BJ-hTERT human fibroblasts by inactivation of endogenous *HIC1* expression through siRNA interference [8]. We next compared the DNA repair capacity of HEK293T cells transfected with wt HIC1 or with the non SUMOylatable E316A point mutant. HIC1 Lysine 314 can be acetylated and SUMOylated [10, 11]. Therefore, we used the E316A mutant (non SUMOylatable since the SUMOylation consensus is  $\phi$ KxE) instead of the K314R mutant since this latter would impede not only SUMOylation but also acetylation or any other potential post-translational modifications on this lysine residue [14]. Results showed that the same amount of DSBs were induced in HEK293T transfected with the two expression vectors. Furthermore, no salient differences were observed during the time-course recovery in normal medium of cells expressing the wt or the E316A SUMO-deficient HIC1 mutant (Figure 2B–2D). Thus, these results unambiguously demonstrate that HIC1 SUMOylation on lysine K314 is not essential for DSBs repair.

### HIC1 SUMOylation increase after 16 h etoposide treatment is dependent of ATM

DSBs elicit a DNA damage response primarily relying on the activation of the ATM or DNA-PKcs kinases which have complementary and non-redundant functions [13, 15]. Whereas ATM has hundreds of substrates, DNA-PKcs phosphorylates a smaller group of proteins involved in DSBs end joining. [16]. We tried to inhibit ATM and DNA-PKcs by a 1 hour pre-treatment with Wortmaninn or with specific pharmacological



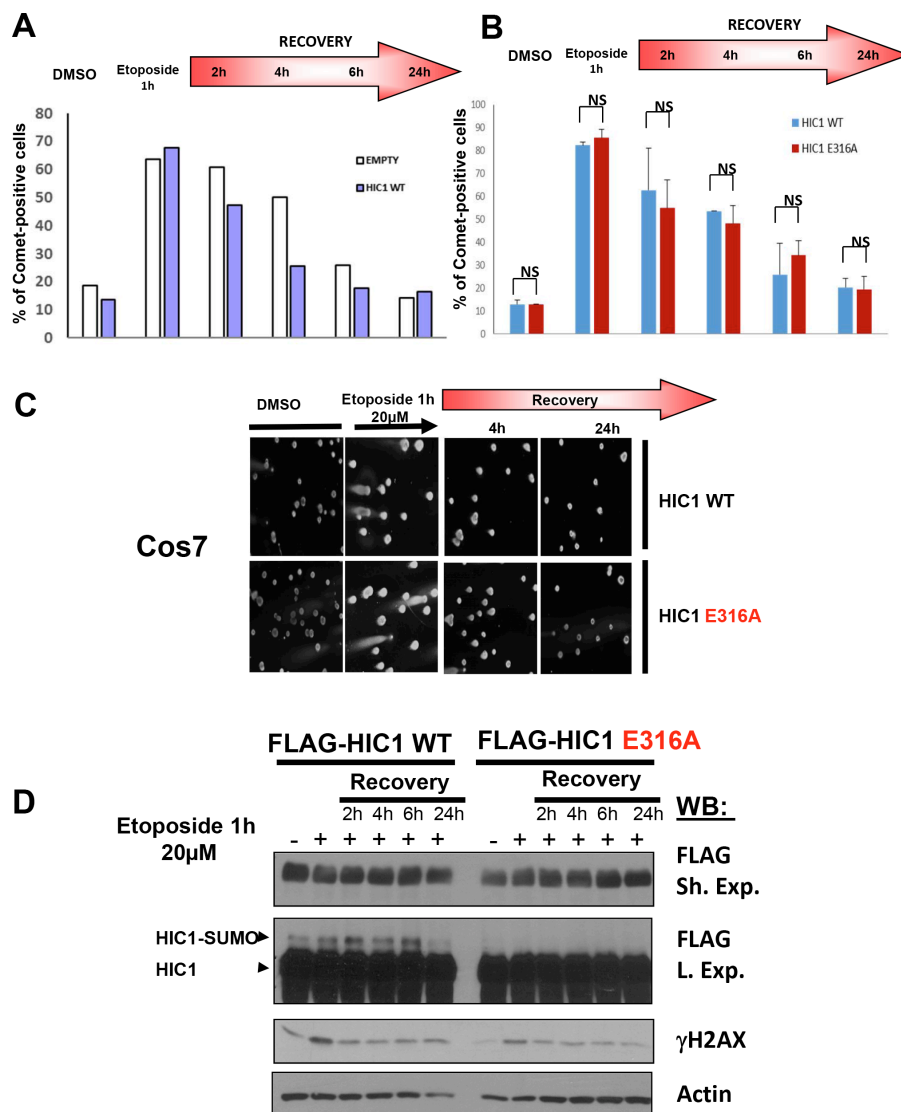


**Figure 1: Repairable DNA double-strand breaks (DSBs) induced by a 1 hour etoposide treatment do not lead to an ATM-dependent increase of HIC1 SUMOylation.** (A) Etoposide-induced non-repairable DSBs lead to an increase of HIC1 SUMOylation. HEK293T cells were transfected with the indicated combination of empty FLAG, FLAG-HIC1, SENP2 and SUMO2 expression vectors. 32 hours after transfection cells were incubated for 16 hours with 20  $\mu$ M etoposide (+) or DMSO (-) as control before direct lysis in denaturing conditions. Total cell extracts were analyzed by Western Blotting (WB) using the indicated antibodies. (B) HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide or DMSO for 1 hour or 16 hours. Cell extracts were prepared as described in panel A) and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Quantification of SUMO-HIC1 to total HIC1 (FLAG) was performed with the Fujifilm MultiGauge software (Bottom Panel) (C) HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide or DMSO for 1 hour. Transfected cells were pre-treated or not with the following inhibitors (Wortmannin; ATMi, ATM inhibitor and DNAPKcsi, DNA-PKcs inhibitor) 1 hour before etoposide treatment, as indicated. Cell extracts were prepared as described in panel B) and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. (D) HEK293T cells were co-transfected with the indicated combinations of expression vectors for FLAG-HIC1 and MTA1 and then incubated for 1 hour in etoposide or with DMSO as control. After lysis in IPH buffer, cells extracts were co-immunoprecipitated with anti-HIC1 antibodies. The immunoprecipitates as well as 2% of the whole cell extract (Input) were analyzed by Western blotting with the anti FLAG and anti MTA1 antibody. Note that the MTA1 antibodies detect a doublet of endogenous proteins in non transfected cells whereas the ectopically expressed MTA1 protein co-migrates with the upper band of the doublet (arrowheads).

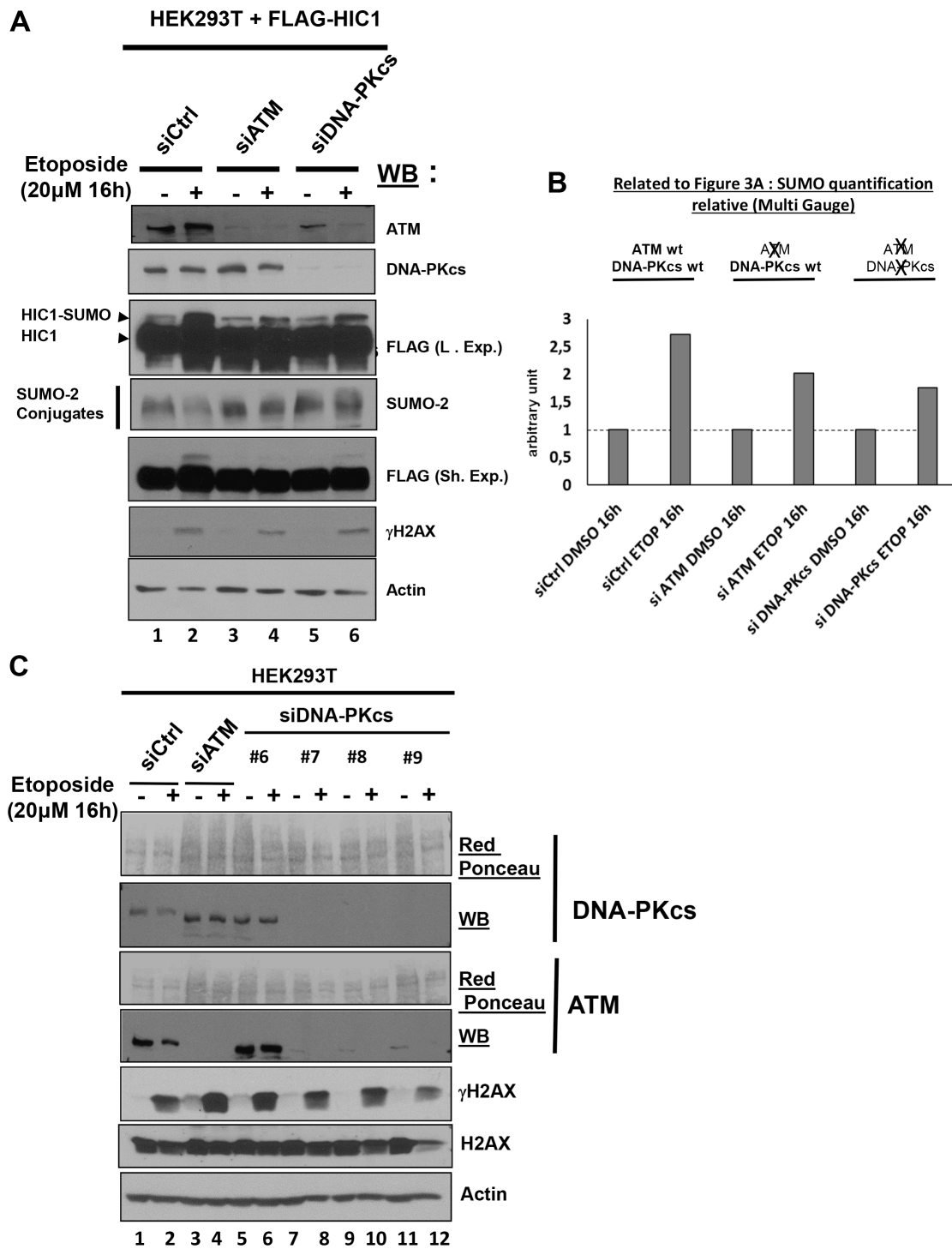


inhibitors for each PIKK prior to a 16 hours etoposide treatment to induce non-repairable DSBs in the presence of these inhibitors as previously performed with the ATM specific inhibitor [8]. However, in these conditions where the DNA-PKcs inhibitor was kept on the cells for 17 (1+16) hours, a strong cytotoxic effect precluding further analyses was observed (data not shown). To circumvent this technical problem, we then used siRNA interference to inactivate DNA-PKcs or ATM, as a positive control.

Upon induction of irreparable damage, the increase of HIC1 SUMOylation was observed in cells transfected with control siRNAs and also in cells transfected with a pool of siRNAs efficiently targeting ATM albeit to a lesser extent (Figure 3A, lanes 1 to 4 and Figure 3B). These findings therefore nicely confirmed our previous results obtained with the pharmacological ATM inhibitor, Ku-55933 [8]. Silencing of DNA-PKcs by siRNAs did not fully abolish the increase of HIC1 SUMOylation but did significantly



**Figure 2: HIC1 SUMOylation is not required for efficient DSBs repair.** (A) Cos7 cells were transfected for 48 hours with wt FLAG-HIC1 or with the empty pcDNA3FLAG expression vector. Cells were either mock-treated with DMSO (-) or treated with 20 µM etoposide (+) for 1 hour. After removal of the drug, cells were allowed to recover in normal medium for various times (2, 4, 6 and 24 hours) and DSBs were monitored by neutral Comet assay. The percentage of Comet positive cells reflecting unrepaired DNA breaks is depicted after counting at least 100 cells in each condition. (B) Cos7 cells were transfected for 48 hours with wt FLAG-HIC1 or with the non-SUMOylatable E316A point mutant. Neutral Comet assays were performed and analyzed as described in panel A). The error bar indicates mean +/- standard deviation of three independent experiments (NS: not significant). (C) Representative Comet images of mock-treated (DMSO) and of cells treated with etoposide for 1 hour after transfection of wt HIC1 or of E316A HIC1 with or without recovery in normal medium for 4 and 24 hours, respectively. (D) Western blot analyses of cells transfected with wt HIC1 or with E316A HIC1. Samples of cells in each condition were taken before the Comet assays and immediately lysed in Laemmli loading buffer. These whole cell extracts were analyzed by Western blot with anti-FLAG antibodies to detect HIC1 and its SUMOylated forms. γH2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively.



**Figure 3: The SUMOylation increase of HIC1 upon induction of irreparable DSBs is dependent on ATM but independent of DNA-PKcs.** (A) HEK293T cells were transfected either with nontargeted control siRNA (siCtrl), either with a pool of four siRNAs targeting ATM (siATM) or with a pool of four siRNAs targeting DNAPKcs (siDNAPKcs). The next day, these cells were transfected with a FLAG-HIC1 expression vector for 24 hours and were then treated with 20 µM etoposide (+) or mock-treated with DMSO (-) as control for 16 hours before direct lysis in denaturing conditions. Total cell extracts were analyzed by Western Blotting (WB) using the indicated antibodies. (B) Quantification of SUMO-HIC1. The HIC1 SUMOylated band in control conditions (siCtrl, DMSO 16 h; lane 1 in panel A) was quantified with the Fujifilm MultiGauge software and given the arbitrary value of 1. The other HIC1 SUMOylated bands (lanes 2 to 6 in panel A) were quantified relative to this value. (C) HEK293T cells were transfected either with nontargeted control siRNA (siCtrl), a pool of four siRNAs targeting ATM (siATM) or with each individual siRNA from the pool targeting DNA-PKcs (siDNA-PKcs). Then, cells were treated with etoposide and total cell extracts were analyzed by Western blot on three different gels (two 6% polyacrylamide gels for DNAPK-cs and ATM; a 15% polyacrylamide gel for γH2AX, H2AX and actin) as described in panel A.

impair it to levels similar to those obtained with ATM siRNAs (Figure 3A, lanes 5 and 6 and Figure 3B). However, in the control Western blots, we noticed that this pool of siRNAs targeting DNA-PKcs down regulate not only the expression of DNA-PKcs but also surprisingly the expression of ATM (Figure 3A, lanes 5 and 6). These results were confirmed by qRT-PCR analyses of ATM expression levels in the same transfected cells (Supplementary Figure S2). To explain this, we performed another experiment testing individually the four siRNAs of the pool targeting DNAPKcs. In Western blots, the three siRNAs that efficiently inhibit DNA-PKcs expression (#7, #8 and #9) also inhibit ATM expression whereas the siRNA DNA-PKcs #6 has no effect on DNAPK-cs and ATM expression (Figure 3C, lanes 5 to 12). As expected, the control siRNAs have no effect on ATM and DNAPK-cs and the pool of siRNAs targeting ATM has no effect on DNA-PKcs expression (Figure 3A, lanes 1 to 4). After a 16 h etoposide treatment, the SUMOylation increase observed in cells transfected with the ATM siRNAs pool which express DNA-PKcs and in cells transfected with the DNAPK-cs siRNAs pool, in which the expression of both DNAPK-cs and ATM are severely inhibited, appears reduced but similar (Figure 3A and 3B). Thus, the increase of HIC1 SUMOylation observed upon induction of irreparable DSBs appears to be primarily dependent upon ATM.

### **HIC1 SUMOylation increase is dependent on the apical kinase ATM but independent of its effector kinase Chk2**

After detection of DSBs by sensors such as the MRN complex, DNA damage signaling is rapidly induced by the activation of the ATM/Chk2 pathway. Whereas the apical ATM kinase is recruited to and stabilized on the DSBs sites, its effector kinase Chk2 becomes phosphorylated by ATM at damage sites but then rapidly dissociates and is distributed throughout the nucleus to phosphorylate numerous downstream targets [2, 17]. To determine whether the HIC1 SUMOylation increase after irreparable DSB induction requires the complete activation of the ATM/Chk2 pathway and is dependent on both ATM and Chk2 activation, FLAG-HIC1-transfected cells were pre-incubated with C3742, a specific inhibitor of Chk2, prior to a 16 hour etoposide treatment (Figure 4A). Both the basal and enhanced SUMOylation of HIC1 observed after induction of irreparable DSBs remained unchanged in presence of the Chk2 inhibitor (Figure 4A, lanes 4 to 8). Similar results were obtained with cells treated with etoposide for 1 hour (Supplementary Figure S4). As controls for the effectiveness of the Chk2 inhibitor, we observed a strong decrease of Chk2 autophosphorylation on Serine 516 as well as of phosphorylation of P53 on Serine 20, a well-known target of Chk2 but no significant

effects on two ATM substrates (T68Chk2 and  $\gamma$ H2AX) or on ATM autophosphorylation (Figure 4A and 4B).

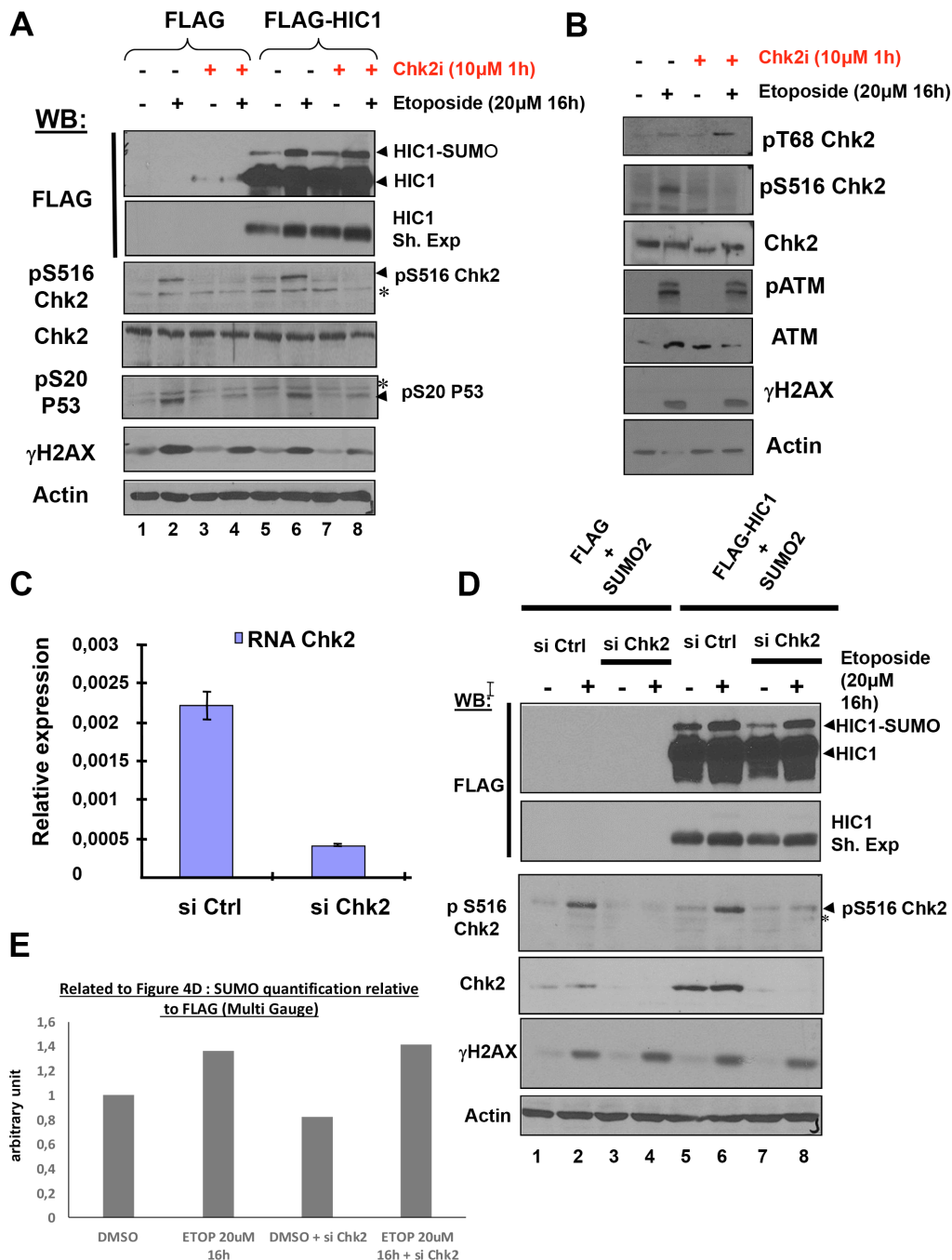
To confirm these results with an independent assay, we used siRNA interference to inactivate Chk2. We first demonstrated the efficiency of a pool of siRNAs (Dharmacon) targeting Chk2 by transfection in HEK293T grown in standard conditions (no etoposide treatment) followed by qRT-PCR and Western blot analyses (Figure 4C and 4D). Using this pool of siRNAs targeting Chk2, we further showed that the increase of HIC1 SUMOylation observed after a 16 hour etoposide treatment is not significantly affected by Chk2 inhibition (Figure 4D and 4E).

In conclusion, the increase of HIC1 SUMOylation upon induction of non-reparable DSBs is dependent upon the apical kinase ATM [8] but not its downstream effector kinase Chk2. Thus, these results strongly suggest that the increase of HIC1 SUMOylation occurs and plays a role in close proximity to chromatin where ATM is activated and stabilized consistent with the “on-site modification” model proposed for SUMOylation.

### **The SIM (SUMO-interacting motif) of MTA1 is required for the interaction with HIC1**

Since the induction of non-reparable DSBs and the resulting increase in SUMOylation of HIC1 favors its interaction with MTA1, we further investigated the molecular mechanisms underpinning the HIC1-MTA1 interaction with a focus on SUMOylation [8, 11]. A SUMOylated protein can interact non-covalently with another protein containing a SIM (SUMO-interacting motif) [14]. MTA1 contains in its C-terminal end a functional SIM motif DEPIVIED (Figure 5A) perfectly fitting with the most canonical class of SIM motifs, a hydrophobic core (V/I)X(V/I)(V/I) flanked by acidic amino acids [18, 19]. Interestingly, triple mutations in the hydrophobic core of the SIM motif in MTA1 (I711A/V712A/I713A, referred to hereafter as AAA) abolished the interaction of MTA1 with HIC1 (Figure 5B, lane 5). MTA1 is also SUMOylated on Lysine 509, which is located in its C-terminal region [19]. However, in contrast with the AAA SIM mutant, wt MTA1 and the K509R non-SUMOylatable mutant similarly interacted with HIC1 in co-immunoprecipitation experiments, demonstrating that MTA1 SUMOylation is not required for this interaction (Figure 5C, lane 5 and 6).

Thus, the SIM motif of MTA1 is essential for the interaction with HIC1, in agreement with the fact that HIC1 SUMOylation favors it, and thus highlights a SUMO-SIM non-covalent interaction between these two proteins [11]. However, the region of interaction between HIC1 and MTA1 previously defined by the prey isolated in the yeast two-hybrid screening as MTA1 amino-acids 397-473 excluded this MTA1 SIM motif (Figure 5A)



**Figure 4: The increase of HIC1 SUMOylation upon irreparable DSB induction by etoposide requires ATM but not its effector kinase Chk2.** (A) HEK293T cells were transfected with the FLAG and FLAG-HIC1 vectors. 48 hours after transfection, cells were pre-incubated or not with the Chk2 inhibitor (Chk2i) for 1 hour and then with etoposide for 16 hours as indicated. Cell extracts were prepared and Western blotting was performed with the indicated antibodies. \*refers to non-specific bands detected by the anti pS516Chk2 (autophosphorylation) and by the anti pS20P53 (Chk2 target) antibodies. γH2AX and actin levels were used as controls for DSBs induction and equal loading, respectively. (B) To control for the inhibition of Chk2, HEK293T cells were transfected and pre-incubated or not with the Chk2 inhibitor (Chk2i) for 1 hour and then with etoposide for 16 hours exactly as in panel A) before lysis and Western blot analyses with the indicated antibodies (C) HEK293T cells grown in normal medium were transfected with siRNA control (siCtrl) or with a Chk2 siRNA pool (siChk2). Total RNAs were extracted and the mRNA expression levels of *Chk2* were assessed by qRT-PCR. Values were normalized to *18S*. (D) HEK293T cells were transfected either with non-target control siRNA (siCtrl) or with a Chk2 siRNA pool (siChk2) before being transfected with the indicated combination of FLAG, FLAG-HIC1 and SUMO-2 expression vectors. Cells were either incubated with DMSO (-) or with 20 μM etoposide (+) for 16 hours. Total cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. \*refers to a non-specific band detected by the anti pS516Chk2, used as a control for Chk2 kinase activity. γH2AX and actin levels were used as controls for DSBs induction and equal loading, respectively. (E) Quantification of SUMO-HIC1 to total HIC1 (FLAG) for lanes 5 to 8 in panel D) was performed with the Fujifilm MultiGauge software.



and the HIC1 K314R non-SUMOylatable mutant still interacts with MTA1, albeit weakly [11]. To elucidate this interaction, we constructed another mutant of the full length HIC1 protein, hereafter referred to as HIC1  $\Delta$ MKHEP, by deleting amino acids 305-326 encompassing this SUMOylation motif. In co-immunoprecipitation experiments, the  $\Delta$ MKHEP HIC1 mutant interacts very weakly with ectopically expressed MTA1 proteins as compared to wt HIC1 (Figure 5D, lanes 5 and 6). Furthermore, this deletion mutant upon overexpression in HEK293T cells is almost unable to co-immunoprecipitate with endogenous MTA1 proteins (Figure 5E, lane 2). Reciprocally, we fused the isolated SUMOylation motif of HIC1 (amino acids 305-326) in frame with a C-terminal DNA-binding domain, a nuclear localization signal and an HA epitope in the Gal4-NLS-HA vector to mimic its localization in the full-length protein. However, this 305-326-HIC1-Gal4 chimera despite being nuclear and displaying a strong repression potential in transient Luciferase reporter assays, is unable to significantly interact with MTA1 (data not shown).

All together these results suggest a complex, multi-domain interaction between HIC1 and MTA1 with major, but not exclusive, roles played by the HIC1 SUMOylation motif and the MTA1 SUMO-interacting motif.

### **HIC1 interacts with MTA3 and this interaction increases upon induction of non-repairable DSBs**

MTA1, the closely related MTA2 and the functionally distinct MTA3 proteins are found in a mutually exclusive manner in different specialized NuRD complexes [20, 21]. Given that HIC1 interacts with MTA1 and this interaction is favoured by HIC1 SUMOylation [8, 11], we thus investigated if HIC1 also interacts with MTA3 and if this interaction increased upon induction of non-repairable DSBs. Co-immunoprecipitation experiments (Co-IPs) in transiently transfected HEK293T cells demonstrated that HIC1 interacts with MTA3 and that this interaction strongly increased when cells were pre-treated with etoposide for 16 hours (Figure 6A, lanes 7 and 8).

To correlate these results with promoter occupancy and transcriptional regulation, we next performed ChIP experiments with chromatin prepared from BJ-hTERT fibroblasts treated or not with etoposide for 16 hours. Using high quality ChIP-grade antibodies for MTA3 [22], these experiments demonstrated a strong enrichment of MTA3 binding onto the HIC1 responsive elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter [6, 11] upon induction of irreparable damage (Figure 6B). Thus, the increase of HIC1 SUMOylation after a 16 hours etoposide treatment is nicely correlated with an increase in HIC1-MTA3 interaction, thus favoring the recruitment of MTA3 onto HIC1 direct target genes. Taken together, these results demonstrate that HIC1 can interact with the MTA1/MTA2 and MTA3 proteins and hence with a wide variety of

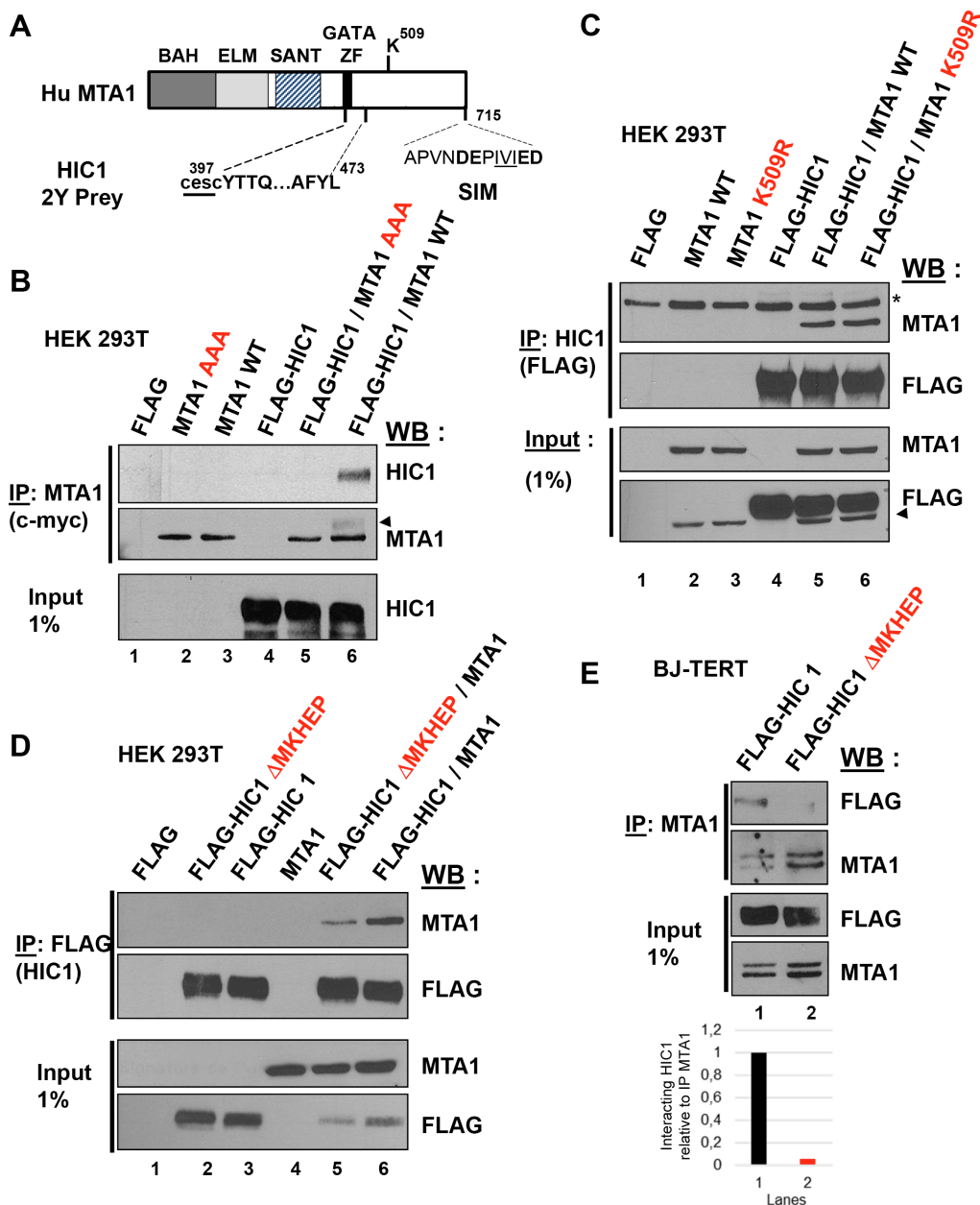
NuRD complexes and that these repressive complexes are favoured to repress some HIC1 target genes and notably *SIRT1* during the apoptotic DNA damage response to non-repairable DSBs.

### **Differential HIC1 recruitment on the SIRT1 promoter upon induction of repairable versus non-repairable DSBs**

We next compared HIC1 binding of the *SIRT1* promoter upon induction of repairable or non-repairable DSBs. We first performed pilot ChIP experiments with BJ-hTERT cells treated or not with DMSO (vehicle) or Etoposide for various times. Whereas HIC1 is bound on the *SIRT1* promoter in control (untreated) conditions, this binding is slightly decreased in the presence of DMSO, especially after the longest treatment times (6 hours) (Figure 7A). ChIP experiments conducted with BJ-hTERT cells treated for 1 h with Etoposide detected a clear decrease of HIC1 binding to the *SIRT1* promoter (Figure 7A). By contrast, a strong increase of HIC1 binding is observed upon induction of non-repairable damage. Notably, SUMOylation of the related BTB/POZ transcriptional repressor PLZF also increases its DNA binding properties [23, 24]. In an independent experiment, HIC1 binding and the recruitment of MTA1 to the *SIRT1* promoter were also increased after a 16 hours etoposide treatment (Figure 7B, left columns). The proneuronal HIC1 target gene, *ATOH1* and GAPDH were used as controls. Thus, these data demonstrate that the induction of non-repairable DSBs increased the binding of HIC1 and its SUMOylation-dependent partners, MTA1 and MTA3, to the *SIRT1* promoter.

### **A short 6 hours etoposide treatment is sufficient to induce a P53-dependent apoptotic response**

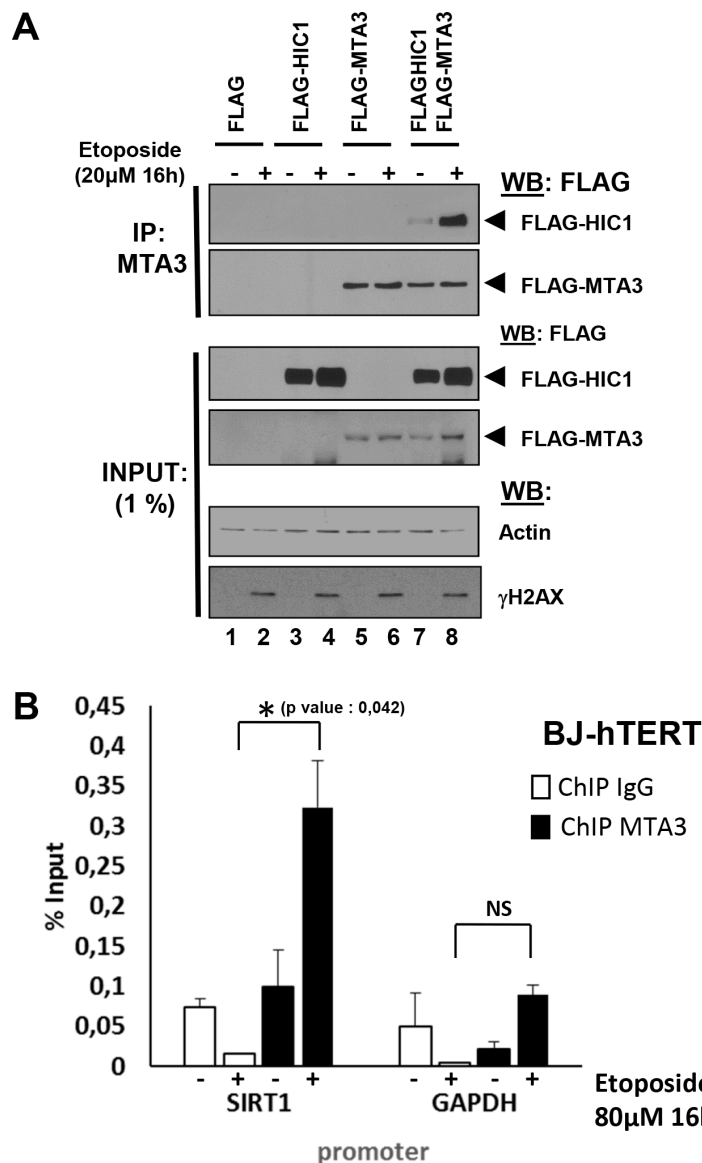
HIC1 directly represses *SIRT1* transcription to modulate the P53-dependent apoptotic response to non-repairable double-strands breaks [6]. Our previous work [8] [11] and the results reported in this study all emphasize an increased HIC1 SUMOylation which favors its interaction with MTA1 or MTA3 in NuRD repressive complexes and hence enhances its transcriptional repression activity during the cellular response to irreparable DSBs (Figures 1 and 5–7). However, a long, 16 hours etoposide treatment could induce a direct transcriptional effect mediated by HIC1 but also an indirect, “second-wave” effect mediated by P53 which is acetylated and hence activated through *SIRT1* inhibition by HIC1. Indeed, in these conditions the pro-apoptotic *Bax*, *Noxa* and *PUMA* genes and the anti-apoptotic *BCL-2* gene which are not known as direct target genes of HIC1 but as direct P53 target genes are activated or repressed, respectively by P53 [6]. To address this issue, we first performed a pilot time-course response of BJ-hTert fibroblasts to etoposide. BJ-hTERT cells



**Figure 5: At least two domains in the C-terminal end of MTA1 are implicated in the interaction with HIC1.** (A) Schematic drawing of the human MTA1 protein. The domains identified in MTA1 include the BAH (Bromo-associated homology), the ELM (Egl-27 and MTA1 homology), the SANT (SW13, ADA2, N-CoR and TF1118) and the GATA-like zinc finger. The region isolated in the two-hybrid screen with HIC1 is shown with the two first cysteines of the GATA zinc finger not present in the isolated prey, shown as lower-case letters underlined [11]. The Lysine 509, which is SUMOylated, and the C-terminal SIM motif are also shown with the hydrophobic core, IVI, underlined and the flanking acidic residues in bold [19]. (B) The SIM (SUMO-interacting motif) in the C-terminal end of MTA1 is required for its interaction with HIC1. After transfection with the indicated expression vectors, HEK293T cells lysates were immunoprecipitated with anti-c-myc antibodies. Immunoprecipitated samples [IP c-myc (MTA1)] and 1% of whole cell extracts (Input) were analyzed by immunoblotting with anti-HIC1 antibodies to detect co-immunoprecipitation. To control for IP efficiency, the membrane was stripped and probed with anti-MTA1 antibodies (the arrow head indicates a remnant of the HIC1 band). (C) SUMOylation of MTA1 on Lysine K509 is not required for the HIC1-MTA1 interaction. A similar experiment was performed in HEK293T with expression vectors for wt MTA1 or its non-SUMOylatable version (K509R) and HIC1. In the top panel, \*refers to a non-specific band detected. In the bottom panel, the arrowhead indicates a remnant of the MTA1 band. (D) The HIC1-MTA1 interaction is also strongly reduced by deletion of the HIC1 SUMOylation motif, ΔMKHEP. A similar Co-IP experiment was realized in HEK293T but with expression vectors for the wt FLAG-HIC1 or the FLAG-HIC1 ΔMKHEP deletion mutant and wt MTA1. (E) Interaction of wt and ΔMKHEP HIC1 with endogenous MTA1 proteins in HEK293T cells. Total extracts of HEK293T transfected with the indicated plasmids were analysed by Co-IP with anti-MTA1 antibodies and immunoblotted with MTA1 and FLAG antibodies. Note that the endogenous MTA1 proteins in the immunoprecipitated materials or in the Inputs migrate as a doublet.

transfected with Control siRNAs or HIC1 siRNAs were treated with etoposide for 1, 6 and 16 hours and analyzed by Western blot for expression of the cell cycle inhibitor P21<sup>CIP1</sup> which is a key factor mediating the P53 response and also a direct target gene of HIC1 [25]. A similar

induction of P21<sup>CIP1</sup> expression is observed after either 6- or 16- hour etoposide treatments as well as a further increase in siHIC1-treated cells as expected for a HIC1 direct target gene (Supplementary Figure S5A). Thus, a shorter 6 hours etoposide treatment is sufficient to increase



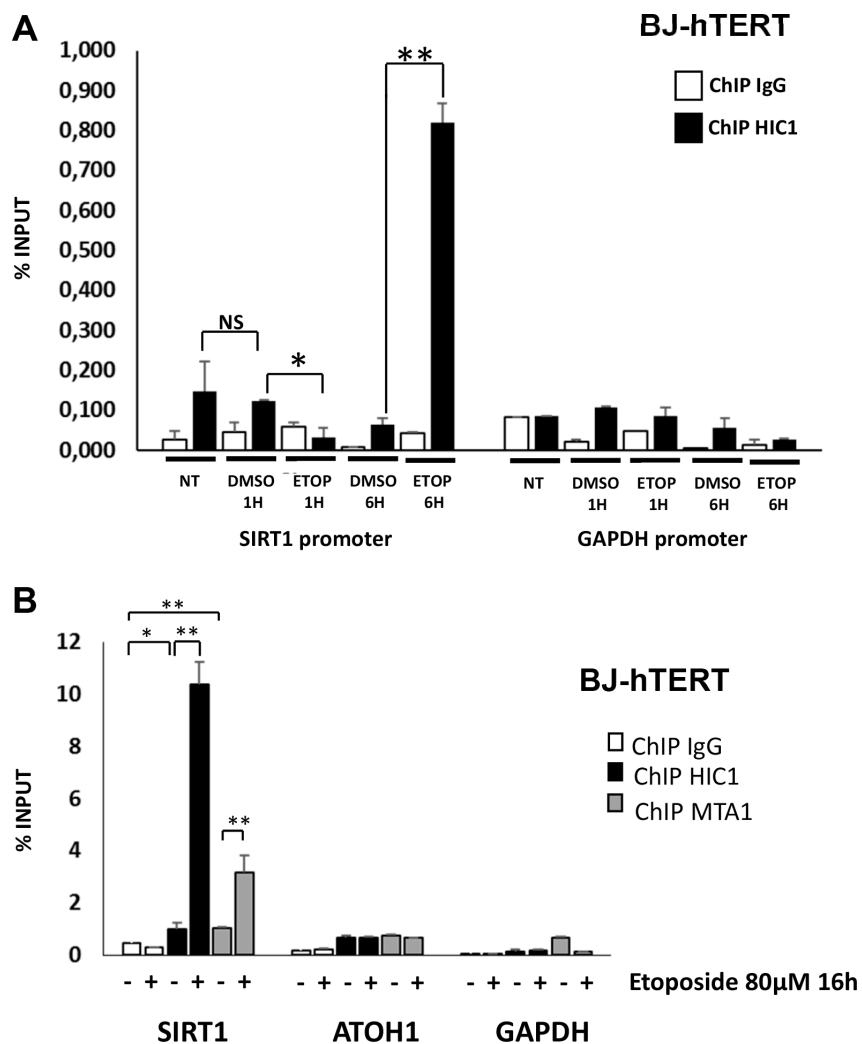
**Figure 6: Irreparable DSBs induced by a 16 hour etoposide treatment lead to an increased interaction of MTA3 with HIC1 and favor its recruitment to the HIC1-response elements in the SIRT1 promoter.** (A) Etoposide-induced non-repairable DSBs lead to an increase of MTA3 interaction with HIC1. HEK293T cells were transfected with the indicated combination of empty FLAG, FLAG-HIC1, and FLAG-MTA3 expression vectors. 32 hours after transfection cells were incubated for 16 hours with 20 µM etoposide (+) or with DMSO (-) as control. After lysis in IPH buffer, cell extracts were co-immunoprecipitated with anti-MTA3 antibodies. The immunoprecipitates as well as 1% of the whole cell extracts were analyzed by SDS/PAGE and transferred to membranes. Relevant pieces of the membranes were cut and analyzed by Western blot with anti-FLAG antibodies to detect MTA3 and HIC1. ΔH2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively. (B) Etoposide-induced irreparable DSB lead to an increase of MTA3 recruitment on the HiRE in the *SIRT1* promoter. Chromatin was prepared from BJ-hTERT fibroblasts mock-treated with DMSO or treated with 80 µM etoposide for 16 hours to induce irreparable DSB and ChIP experiments were performed with antibodies against MTA3 or rabbit IgG. The bound material was eluted and analysed by quantitative PCR using primers flanking the HIC1-responsive elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter [6], as previously described [46]. *GAPDH* was used as a nonbinding control. Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \**P* < 0.05. NS corresponds to values that are not statistically significantly different.

HIC1 recruitment to the *SIRT1* promoter (Figure 7) and to induce a P53-dependent apoptotic response while limiting the induction of indirect HIC1 target genes.

### Identification of new potential target genes regulated by HIC1 SUMOylation

Given our findings of the important role played by HIC1 SUMOylation in the transcriptional response to irreparable DSBs, we chose to employ a gene expression profiling approach to identify candidate genes for HIC1-mediated transcriptional repression after the induction of DNA damage. BJ-hTERT cells transfected with either

siHIC1 (HIC1<sup>-</sup>) or sicontrol (HIC1<sup>+</sup>) oligomers were subjected to etoposide induced DNA damage. Western blot analyses confirmed the efficient inactivation of HIC1 by the siRNA as well as the induction of P53 and p21 after etoposide treatment (Supplementary Figure S5B). Total RNA was isolated from treated and untreated cells in triplicate and subjected to gene expression profiling using the ILLUMINA HumanHT-12 v4 Expression BeadChip kit. To identify potential target genes, two normalization strategies were employed. In the first, HIC1<sup>+</sup> and HIC1<sup>-</sup> etoposide treated cells (conditions II and IV) were first normalized to their untreated counterparts (conditions I and III) to identify genes that became repressed as a result of

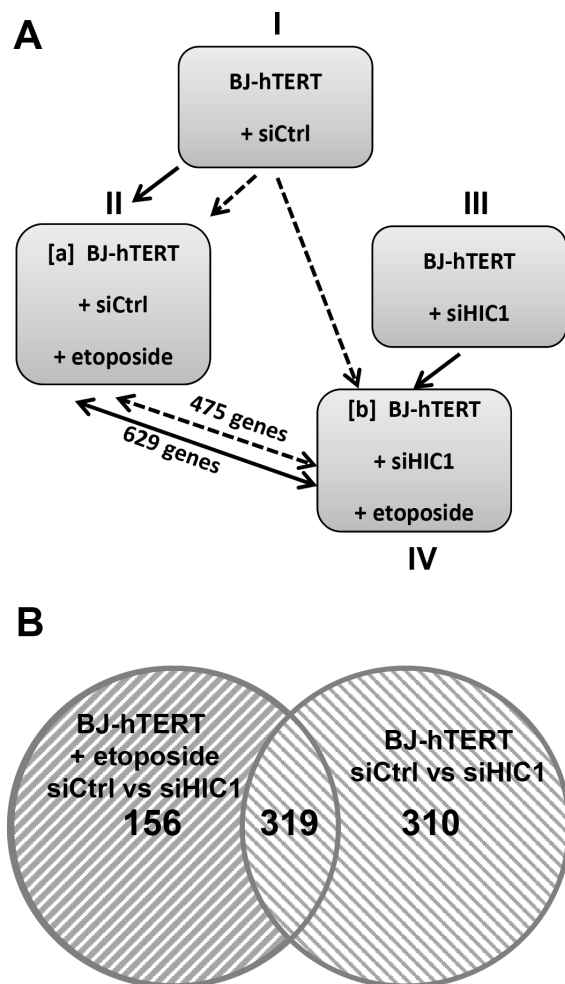


**Figure 7: HIC1 and MTA1 recruitment to the HIC1-response elements in the *SIRT1* promoter is increased upon induction of non-repairable DSBs.** (A) HIC1 recruitment to the HiRE in the *SIRT1* promoter in various conditions. Chromatin was prepared from BJ-hTERT fibroblasts not-treated, mock-treated with DMSO or treated with 80  $\mu$ M etoposide for various times and ChIP experiments were performed with antibodies against HIC1 or rabbit IgG. The bound material was eluted and analysed by quantitative PCR using primers flanking the HIC1-responsive elements (HiRE) in the *SIRT1* promoter [6], as previously described [46]. *GAPDH* was used as a nonbinding control. (B) Etoposide-induced irreparable DSBs lead to an increase of HIC1 and MTA1 recruitment to the HiRE in the *SIRT1* promoter. Chromatin was prepared from BJ-TERT fibroblasts mock-treated with DMSO or treated with 20 mM etoposide for 16 hours to induce irreparable DSBs and ChIP experiments were performed with antibodies against HIC1, MTA1 or rabbit IgG as described in panel A). Values that are statistically significantly different are indicated by bars and asterisks as follows: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . NS corresponds to values that are not statistically significantly different.



DNA damage. In order to determine which of those genes were candidates for SUMO-HIC1 mediated repression, the list of repressed genes in HIC1<sup>-</sup> cells was subtracted from those repressed in HIC1<sup>+</sup> cells yielding 629 genes repressed in a HIC1 replete context and not in the absence of HIC1 (Figure 8A, solid lines; Supplementary Table S1). In the second normalization strategy, mRNA expression from both the HIC1<sup>+</sup> and HIC1<sup>-</sup> BJ-hTERT cells that were treated with etoposide (conditions II and IV) were compared back to the HIC1 sufficient untreated cells (condition I). The transcripts that were significantly repressed in the HIC1<sup>-</sup> context were subtracted from those repressed in the HIC1<sup>+</sup> cells leaving 475 genes whose repression

was potentially mediated by HIC1 (Figure 8A, dashed lines; Supplementary Table S2). The agreement between the resulting gene lists was substantial with 319 genes representing the intersection of these gene sets (Figure 8B, Supplementary Table S3). It is important to note that these genes likely represent both direct and indirect HIC1-mediated transcriptional repression. The union of these lists (785 genes) was used to identify interaction maps using Ingenuity Pathway Analysis software. The top canonical pathway mapped by the repressed gene set was “Role of BRCA1 in DNA Damage Response”. Measured by the number of molecules represented, “Cell Death” and “Cell Cycle” were the top cellular functions identified



**Figure 8: Identification of the genes regulated in BJ-hTERT human fibroblasts by HIC1 in the presence and absence of etoposide to induce irreparable DSB.** (A) Schematic drawing of the experimental design of the study and of the 2 normalization strategies used to identify the genes regulated by HIC1 in the presence and absence of a 6 hours etoposide treatment to induce irreparable DSBs. Four experimental conditions were used and compared using two different comparison strategies. In the first comparison strategy (Strategy #1 : normalization of IV to III, shown as black lines), BJ-hTERT siCtrl cells treated with etoposide were compared to control cells (siCtrl, no etoposide) to define genes repressed by etoposide and thus containing a subset of genes repressed by SUMOylated HIC1. Then, BJ-hTERT siHIC1 cells treated or not with etoposide were compared to define genes still repressed by etoposide in a HIC1-deficient context. Subtracting [IV] from [III] yields 629 target genes repressed in response to DSBs and dependent upon HIC1 SUMOylation. In the second strategy (Strategy #2: normalization of IV to I, shown as dotted lines), BJ-hTERT siCtrl and BJ-hTERT siHIC1 cells, both treated with etoposide, were each compared to control cells (siCtrl, no etoposide). In that case, subtracting [IV] from [II] yields 475 target genes. (B) Venn diagrams showing the overlap of the 629 and 475 target genes from the 2 normalization strategies used yields a strong overlap of 319 genes (see text for detail).

with 80 and 58 genes represented respectively (data not shown). Since HIC1 SUMOylation increases its interaction with MTA1, we next compared these HIC1 target genes with MTA1 target genes obtained through gene profiling experiments of wt and *Mta1*<sup>-/-</sup> murine embryos fibroblasts (MEFs) [26]. This comparison highlighted 17 genes (Figure 9A). Among them, *CXCI12*, *EPHA4*, *LPHN2*, *TGFβR3* and *TRIB2* were validated by qRT-PCR as potential target genes regulated by HIC1 SUMOylation. Indeed, they are activated in siHIC1 BJ-hTERT fibroblasts as compared to siCtrl cells in control conditions (DMSO) and further repressed in siCtrl cells treated with etoposide (Figure 9B). Thus, we were able to place HIC1 and its interaction with NuRD complexes through its increased SUMOylation among the canonical pathways responsible for the transcriptional response to irreparable DSBs while yielding further potential targets of HIC1 for future validation.

## DISCUSSION

The cellular response to different types of DNA damages involves a complex interplay of various post-translational modifications including phosphorylation by PIKK kinases, Ubiquitinylation, PARylation and SUMOylation among many others [27–29]. SUMOylation is a very dynamic post-translational modification, involved essentially in regulation of protein-protein interaction and organization of macromolecular complexes through SIMs (SUMO-interacting motifs) that allow effector proteins to engage SUMO-modified substrates [12, 30]. Numerous proteins modified by SUMOylation have been identified and many of them are associated with transcriptional repression [30, 31]. SUMOylation is also a very labile PTM affecting only a small percentage of target proteins, the so-called “SUMO paradox” [12] and is thus difficult to detect. It is also becoming increasingly clear that SUMOylation plays a key role in the regulation of DNA damage repair and responses with, for example, an increased presence of SUMO at sites of DNA damage [27] and an orchestrated SUMOylation of subsets of chromatin remodelers to decrease global transcription upon DNA damage [32, 33]. SUMOylation is also implicated in another important aspect of the repair process, determining the kinetics and mechanisms for the repair of DSBs occurring either in open and transcriptionally active euchromatin or in highly compacted and transcriptionally inactive heterochromatin [34, 35]. The chromatin compaction found in heterochromatin on one hand protects it from DNA damages but on the other hand impairs the repair process once the damage occurs. Therefore, the majority of DSBs in heterochromatin are repaired with slow kinetics through ATM-dependent mechanisms of chromatin “relaxation”, as exemplified by the ATM-mediated phosphorylation of KAP1. KAP1, the obligate co-repressor for KRAB zinc fingers, the

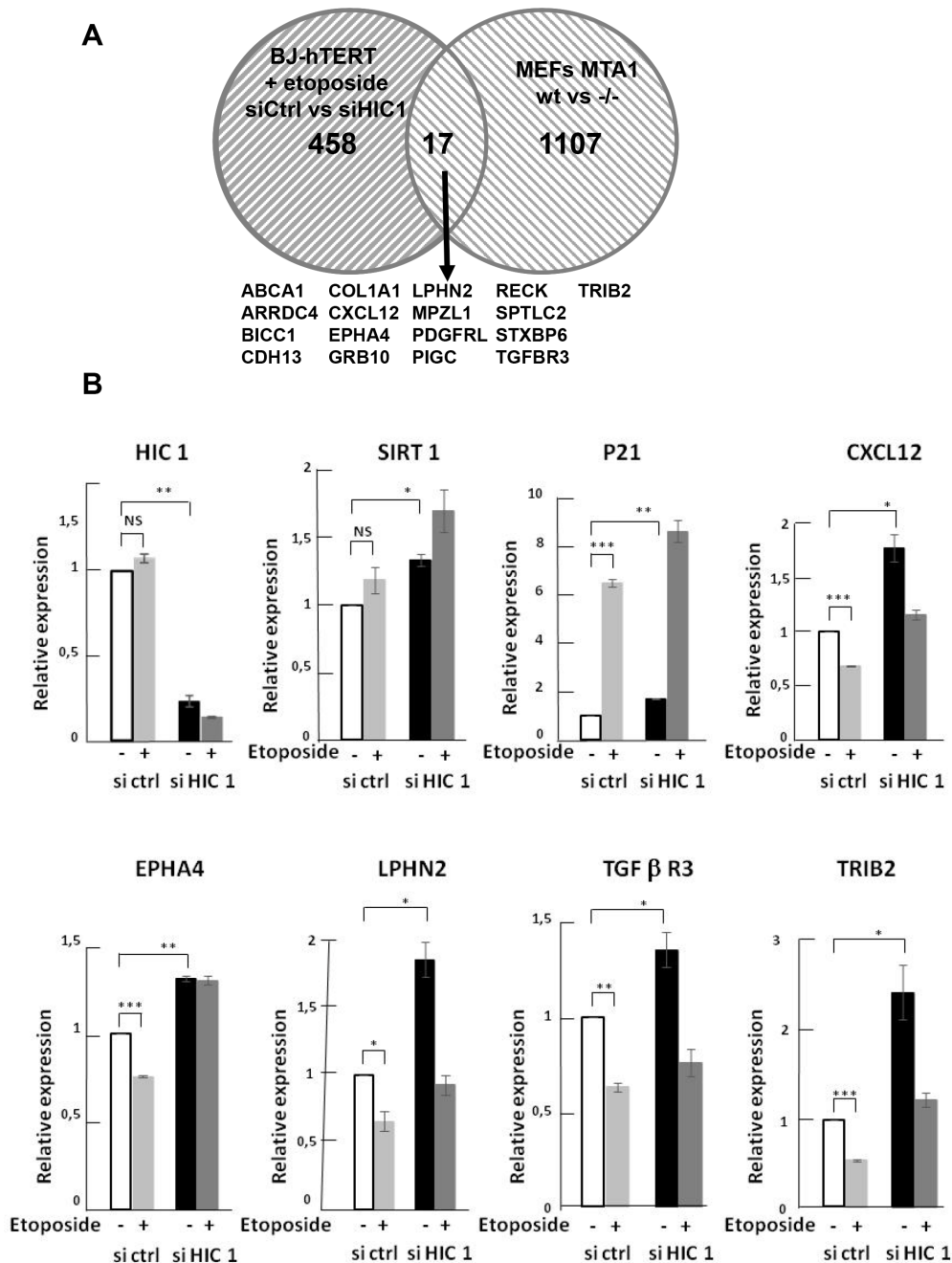
largest family of zinc-finger transcription factors, can undergo SUMOylation. KAP1 SUMOylation mediates its interaction with NuRD complexes owing to a SIM motif found in the C-terminal part of the ATP-dependent chromatin remodeling subunit CHD3 [36]. Upon DSB induction, phosphorylation of KAP1 Ser804 produces a SIM-like domain which interferes with the KAP1-SUMO/SIM-CHD3 interaction thereby causing dispersal of CHD3/NuRD from the DSBs and chromatin relaxation allowing repair to occur [37, 38].

In this manuscript, we have studied in-depth the SUMOylation of the transcriptional repressor HIC1 in various aspects of the DDR to DSBs. Indeed, HIC1 was originally characterized as a tumor suppressor gene encoding a transcriptional repressor facilitating the P53 dependent apoptotic response [4, 6, 5]. But HIC1 is also involved in the repair of DSBs since BJ-hTERT fibroblasts treated for 1 hour with etoposide and siRNAs targeting HIC1 repairs DSBs less efficiently than cells treated with control siRNAs [8]. Therefore, the current study nicely ties together HIC1 and the two major areas of SUMOylation research, the role of SUMOylation in transcriptional repression and its role in the DNA damage response [30, 33]. In that setting, we previously demonstrated an ATM-dependent increase in HIC1 SUMOylation favoring the interaction with MTA1, a core component of NuRD chromatin remodeling complexes in response to irreparable DSBs induced by a 16 hour etoposide treatment [8, 11]. On the contrary, HIC1 SUMOylation remains globally at basal levels when cells are exposed to etoposide for 1 hour to induce repairable damage, even in presence of the ATM inhibitor Ku-56933 (Figure 1). To date the only functions ascribed to HIC1 SUMOylation are to increase the transcriptional repression potential of a HIC1-Gal4 chimera in transient luciferase assays [10] and to enhance the interaction of HIC1 with the corepressor MTA1 [8, 11]. Even though its SUMOylation levels did not increase, HIC1 can still be SUMOylated when cells are exposed to etoposide for 1 hour and SUMOylation is one of the major post-transcriptional modifications involved in the DNA damage response [27]. However, results of the Comet assays performed with the non-SUMOylatable HIC1 E316A strongly argue against a positive role of HIC1 SUMOylation and hence of HIC1-NuRD interactions in the well documented functions for SUMOylation in DSBs repair: inhibition of local transcription at DSBs, repression of target genes during the repair process or heterochromatin relaxation (Figure 10).

In contrast to the obvious lack of necessity for the cellular response to repairable DSBs demonstrated in this study, the increase of HIC1 SUMOylation, important for the response to irreparable damage, has previously been shown to be dependent on ATM (Figure 3) [8]. We have further refined this finding by showing that this HIC1 SUMOylation increase is independent of the effector nucleoplasmic kinase, Chk2 (Figure 4). Since ATM is

stabilized and activated at chromatin, these results are in strong agreement with the “on-site modification” model for SUMOylation [39]. Furthermore, we have shown that the functionally distinct MTA3 corepressor also interacts with HIC1 in a SUMOylation-dependant manner. In ChIP experiments, we also observed an increased binding of HIC1 to the *SIRT1* promoter. This could be explained at

least in part by the increased SUMOylation of HIC1 since SUMOylation increased the DNA-binding properties of the BTB/POZ transcriptional repressor PLZF [23, 24] and the POU transcription factor Oct4 [40]. As a whole, these results firmly link the increase of HIC1 SUMOylation to a role in the transcriptional repression of target genes by NuRD repressive complexes to orchestrate the apoptotic



**Figure 9: Identification of target genes potentially regulated in BJ-hTERT human fibroblasts by HIC1 SUMOylation and MTA1.** (A) Venn diagrams showing the overlap of the 475 target genes from the normalization strategy #2 and the 1024 genes affected by MTA1 knock out in murine embryonic fibroblasts (MEFs) [26]. (B) Validation by qRT-PCR of the microarray data showing differential regulation of some selected genes in BJ-hTERT cells. RNAs were extracted from BJ-hTERT using the same four experimental conditions as in the microarrays analyses. Selected genes (*CXCL12*, *EPHA4*, *LPHN2*, *TGFβR3* and *TRIB2*) were analysed by qRT-PCR analyses and showed the expected differential regulation (see text for detail). The expression of *HIC1* and of its direct target genes *SIRT1* and *P21* were also tested as positive controls.

DNA damage response (Figure 10). Two key genes in this process are *SIRT1* [6] and *p21* [25]. To have a more global vision of the HIC1 target genes involved in the transcriptional DNA damage response to non-repairable DSBs, we have conducted gene profiling analyses of BJ-hTERT fibroblasts with or without HIC1 inactivation by RNA interference and treated or not with etoposide for 6 hours. Through two thorough normalization strategies we were able to identify 475 genes regulated by HIC1 in an etoposide-dependent manner (Figure 9). In good agreement with the longstanding role of HIC1 in the P53-dependent apoptotic response [6] and the importance of HIC1 SUMOylation in this process as shown by our previous work [8, 10, 11] and extended in this study, many of these genes are implicated in cell death and cell cycle control. Further crossing these 475 genes with known MTA1 target genes highlighted 17 common genes, which could be HIC1 direct or indirect target genes. Among them, we validated by qRT-PCR analyses three receptors, the Ephrin A4 tyrosine kinase receptor, the GPCR receptor Latrophilin2 (LPHN2) and the TGF-beta type III receptor, a membrane proteoglycan that often functions as a co-receptor with other TGF-beta receptor superfamily members. Interestingly, we also defined as potential new HIC1 target genes TRIB2, a pro-apototic-

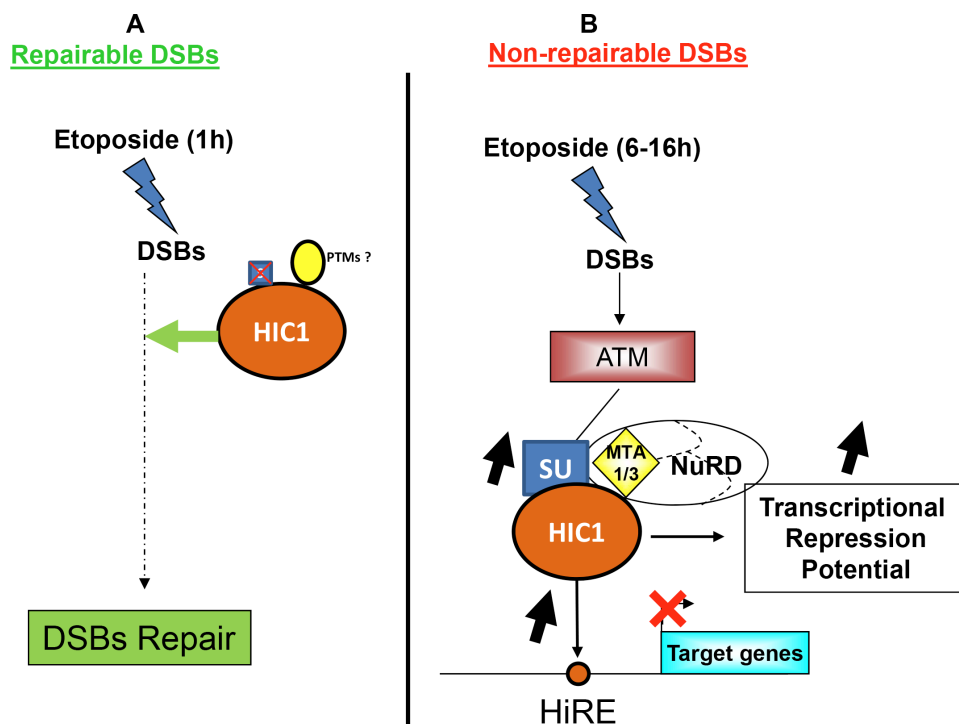
molecule belonging to the atypical protein kinase family Tribbles [41] and SDF-1/CXCL12, a chemokine which is the ligand for the G-protein coupled chemokine (C-X-C motif) receptors, CXCR4 and CXCR7, the latter being a direct HIC1 target gene [42, 43].

In conclusion, our work demonstrates that HIC1 SUMOylation is dispensable for DNA DSB repair but essential as a transcriptional repressor for the apoptotic response in the case of irreparable DSBs. Further studies are currently in progress to decipher the functional role of HIC1 in DNA repair. In particular, we are trying to identify potential HIC1 PTMs specifically induced when cells are exposed to repairable DSBs. These analyses would help to better decipher and understand the contribution of HIC1 to the repair process.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines and transfection

Cos-7, HEK293T and BJ-hTERT 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 humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.



**Figure 10: HIC1 SUMOylation is dispensable for DNA repair but essential for the transcriptional response to non-repairable DSBs.** (A) Upon induction of repairable DSBs, HIC1 participates in the early steps of the repair process [8] by a mechanism that still remains to be deciphered. However, this is independent of HIC1 SUMOylation but could be due to other post-translational modifications. (B) Upon induction of non-repairable DSBs, the activated ATM kinase increases HIC1 SUMOylation which in turn enhances the binding of HIC1 to its responsive elements (HiRE) in the promoters of target genes (e.g. *SIRT1*) as well as the interaction of HIC1 with the MTA1 or MTA3 co-repressors to increase the transcriptional repression of direct target genes.



## Plasmids and chemicals

The expression vectors for full-length FLAG-HIC1, the non-SUMOylatable FLAG-HIC1 E316A, for His-SUMO2, Myc-MTA1, the non SUMOylatable Myc-MTA1 K509R and SIM-deficient Myc-MTA1 AAA mutants have been described previously [8, 10, 19]. The  $\Delta$ MKHEP deletion mutant was generated by the two-round PCR mutagenesis strategy.

Etoposide and the Chk2 inhibitor C3742 (Chk2 inhibitor II hydrate) were purchased from Sigma-Aldrich. Wortmannin (Calbiochem), a PI3K inhibitor which also inhibits PIKKs and ATM (KU-55933; Santa Cruz Biotechnology) and DNA-PKcs (NU-7441, Selleckchem) inhibitors were dissolved in DMSO and used at a final concentration of 10  $\mu$ M. Inhibitors were added to culture medium 1 hour before subsequent treatments.

## Transfection and co-immunoprecipitation

Cells were transfected in Opti-MEM (Invitrogen) by the PEI method using ExGen 500 (Euromedex) as previously described with 2.5  $\mu$ g of DNA corresponding to the relevant expression vectors or the empty vector used as control. Cells were transfected for 6 h and then incubated in fresh complete medium.

For co-immunoprecipitation analyses (Co-IPs), 48 h after transfection, cells were rinsed with cold PBS and lysed in cold IPH buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, protease inhibitor cocktail [Roche]). Cell lysates were sonicated briefly and cleared by centrifugation (14,000 rpm, 4°C, 15 min). The supernatants were pre-cleared with 15  $\mu$ l of protein A/G sepharose beads (Amersham Bioscience) incubating during 1 hour on a rotator at 4°C. Then, lysates were incubated with 2  $\mu$ g of antibody on a rotator at 4°C overnight. Later, 20  $\mu$ l of protein A/G beads were added and incubated 30 min at 4°C. Finally, the beads were washed three times with IPH buffer. Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer before analyses by SDS/PAGE followed by immunoblotting.

## Small interfering RNA

HEK293T cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 10 nM small interfering RNA targeting Chk2 (Human CHEK2 siGENOME-SMARTpool M-003256-06-0005, Dharmacon), ATM (Human ATM siGENOME siRNA-SMARTpool M-003201-04-0005, Dharmacon) or a scrambled control sequence (si Ctrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon). For DNA-PKcs (referenced as PRKDC), we prepared a pool with four individual ON-TARGET plus PRKDC siRNAs (LQ-005030-00-0005, Dharmacon) or tested these four siRNAs individually [44]. 24 hours after siRNA transfection, cells were transfected with FLAG or

FLAG-HIC1 vectors and treated with etoposide 24 hours later as previously described [8].

## Comet assays

Cos7 cells were transfected for 48 h with expression vectors either for wt FLAG-HIC1 and the empty FLAG expression vector or for the non-SUMOylatable point mutant FLAG-HIC1 E316A and analyzed by neutral Comet assays, as previously described [8, 44]. For each condition, 2,000 cells were suspended in 80  $\mu$ 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. Comet slides were next placed in a horizontal electrophoresis unit, and let to equilibrate in electrophoresis buffer (Tris 89 mM, Boric acid 89 mM, EDTA 2 mM, pH8 to detect double strand breaks) for 10 min at 4°C, in the dark. After migration (40 V for 25 minutes), the slides were stained with SYBR green (Molecular Probes-1000X) according to manufacturer's recommendations.

## Quantitative RT-PCR

Total RNA was reverse transcribed using random primers and MultiScribe<sup>TM</sup> 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 an internal control [45]. The primers used for the qRT-PCR analyses are summarized in Supplementary Table S4.

## 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 [8].

Commercial antibodies of the following specificities were used: FLAG M2 from Sigma; Anti MTA1 (sc-9445 for WB and sc-10813 for IP) from Santa Cruz and Anti MTA3 (ab87275) from Abcam;  $\gamma$ H2AX, H2AX (total), pS1681ATM, ATM total, DNA-PKcs total, DNA-PKcs (pS2056) from Abcam, Chk2, pS516Chk2, pT68Chk2 pS20P53 and anti-actin antibodies (sc-1616-R) from Santa Cruz Biotechnology. The secondary antibodies were horseradish peroxidase-linked antibodies against rabbit, rat and mouse immunoglobulins (Amersham Biosciences); goat immunoglobulins (Southern Biotech).

To analyze the SUMOylation of HIC1 proteins by Western blotting analyses, transfected HEK293T cells pelleted by centrifugation were directly lysed in Laemmli

loading buffer, boiled for 10 minutes and processed for Western blotting as described above.

### Chromatin immunoprecipitation

Human BJ-hTERT fibroblasts were treated with DMSO or Etoposide for 16 hours, washed with PBS and resuspended in 0.5 ml PBS for  $5 \times 10^6$  cells. Then, cells were fixed by adding formaldehyde to a final concentration of 1% for 8 min at room temperature. To stop fixation, glycine was added to a final concentration of 0.125 M. After 5 min at room temperature, cells were collected by centrifugation (1500 rpm, at 4°C, 5 min). The supernatants were removed and we lysed cells by resuspension in chilled cell lysis buffer for 10 min on a rotator at 4°C. Then, the samples were pelleted, resuspended in 200  $\mu$ l nuclei lysis buffer and sonicated to chromatin with an average size of 250 bp using a cooling BioRuptor (Diagenode, Belgium). 20  $\mu$ g of chromatin was immunoprecipitated with indicated antibodies and real-time PCR analyses were performed as described [22]. The primers used for *GAPDH*, *SIRT1* and *ATO1* have been previously described [46].

### Microarrays analyses

Total RNA was prepared from BJ-hTERT human fibroblasts transfected with siCtrl or siHIC1 and mock-treated (DMSO) or treated with etoposide for 6 hours. Samples were prepared for gene expression microarrays using the Illumina® TotalPrep™-96 RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX). In brief, 200 ng of total RNA for each sample underwent 1st and 2nd strand cDNA synthesis followed by an *in vitro* transcription (IVT) amplification that generates biotinylated, antisense RNA copies of each mRNA, referred to as cRNA. For each sample, 750 ng of cRNA was hybridized to a HumanHT-12v4 BeadChip array (Illumina, Inc., San Diego, CA) for 16 hours, followed by washing, blocking, and streptavidin-Cy3 staining according to the Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization protocol (Illumina, Inc., San Diego, CA). The arrays were scanned using an Illumina HiScanSQ System and the resultant image files were analyzed by GenomeStudio™ Gene Expression Module (Illumina, Inc., San Diego, CA). Significance of repression was determined in a comparison context between etoposide treated and null in the HIC1 replete context using an FDR corrected *p*-value of 0.05 regardless of magnitude.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Pr Rakesh Kumar for the gift of the MTA1 AAA and K509R mutants. The authors would like to acknowledge Svetlana Ghimbovski for her assistance with the microarray data analysis.

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no disclosure of potential conflicts of interest.

### GRANT SUPPORT

We thank the CNRS, the “Association pour la Recherche sur le Cancer” (ARC) and the “Ligue Nationale Contre le Cancer”, Comités de la Somme et du Pas de Calais for their financial support. This work was partially supported by the National Centers for Medical Rehabilitation Research, Molecular and Functional Outcome Measures in Rehabilitation Medicine Core, NIH NCMRR/NINDS 2R24HD050846-06.

### REFERENCES

1. Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell*. 2010; 40:179–204.
2. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes and development*. 2011; 25:409–433.
3. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews* 14, 197–210.
4. Wales MM, Biel MA, el Deiry W, Nelkin BD, Issa JP, Cavenee WK, Kuerbitz SJ, Baylin SB. p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3. *Nature medicine*. 1995; 1:570–577.
5. Rood BR, Leprince D. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2013; 17:811–827.
6. 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; 123:437–448.
7. Dehennaut V, Leprince D. Implication of HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) in the DNA damage response. *Bulletin du cancer*. 2009; 96: E66–72.
8. Dehennaut V, Loison I, Dubuissez M, Nassour J, Abbadie C, Leprince D. DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair. *The Journal of biological chemistry*. 2013; 288, 10254–10264.
9. Fleuriet C, Touka M, Boulay G, Guerardel C, Rood BR, Leprince D. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2009; 41:26–33.
10. Stankovic-Valentin N, Deltour S, Seeler J, Pinte S, Vergoten G, Guerardel C, Dejean A, Leprince D. An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional

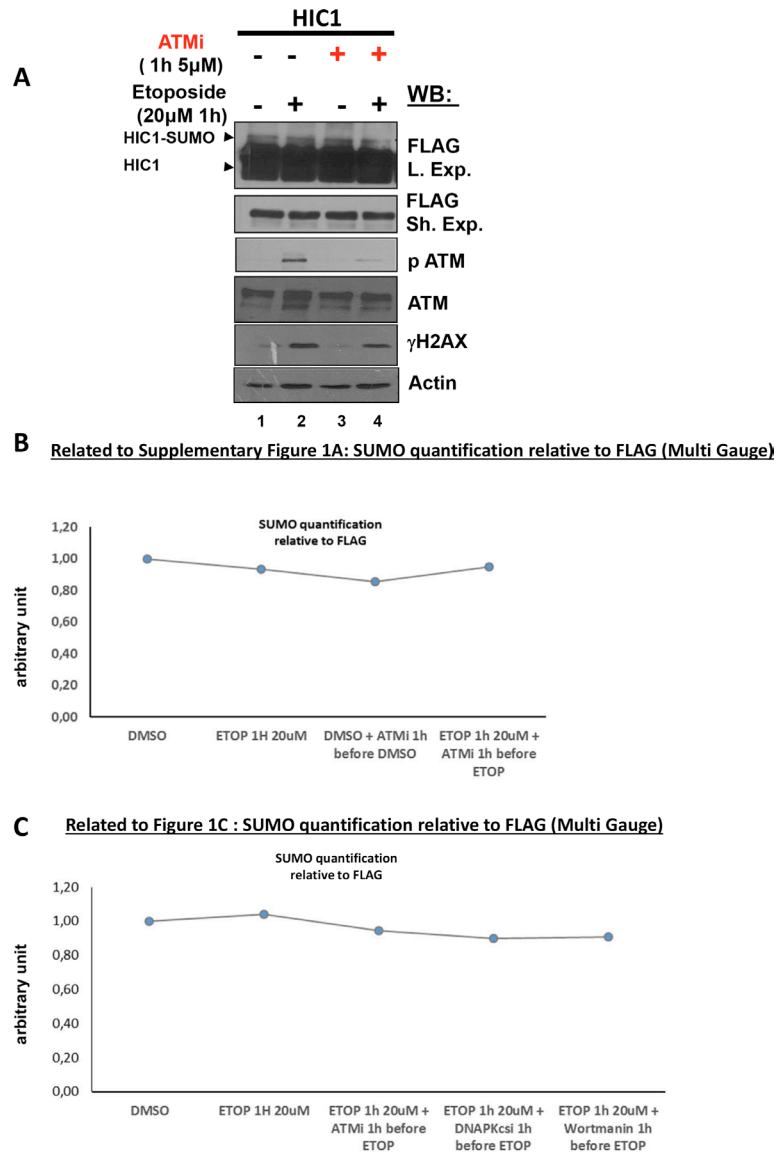
- repression activity. *Molecular and cellular biology*. 2007; 27:2661–2675.
11. Van Rechem C, Boulay G, Pinte S, Stankovic-Valentin N, Guerardel C, Leprince D Differential regulation of HIC1 target genes by CtBP and NuRD, via an acetylation/SUMOylation switch, in quiescent versus proliferating cells. *Molecular and cellular biology*. 2010; 30:4045–4059.
  12. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Molecular cell*. 2005; 18:1–12.
  13. Sirbu BM, Cortez D DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5: a012724.
  14. Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature reviews Mol Cell Biol*. 2010; 11:861–871.
  15. Caron P, Choudjaye J, Clouaire T, Bugler B, Daburon V, Aguirrebengoa M, Mangeat T, Iacovoni JS, Alvarez-Quilon A, Cortes-Ledesma F, Legube G. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell reports*. 2015; 13:1598–1609.
  16. Hill R, Lee PW. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell cycle*. 2010; 9:3460–3469.
  17. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology*. 2003; 5:255–260.
  18. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry*. 2006; 281:16117–16127.
  19. Cong L, Pakala SB, Ohshiro K, Li DQ, Kumar R SUMOylation and SUMO-interacting motif (SIM) of metastasis tumor antigen 1 (MTA1) synergistically regulate its transcriptional repressor function. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286:43793–43808.
  20. Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. *Nuclear receptor signaling*. 2007; 5: e010.
  21. Dege C, Hagman J. Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and T-lymphocyte development and function. *Immunological reviews*. 2014; 261:126–140.
  22. Dubuissez M, Loison I, Paget S, Vorng H, Ait-Yahia S, Rohr O, Tscicopoulos A, Leprince D. “PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4+ T cell activation”. *Molecular and cellular biology*. 2016; 36:1881–189.
  23. Kang SI, Chang WJ, Cho SG, Kim IY. Modification of promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) by SUMO-1 conjugation regulates its transcriptional repressor activity. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278:51479–51483.
  24. Chao TT, Chang CC, Shih HM. SUMO modification modulates the transrepression activity of PLZF. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 358:475–482.
  25. 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). *Biochemical and biophysical research communications*. 2013; 430:49–53.
  26. Ghanta KS, Li DQ, Eswaran J, Kumar R. Gene profiling of MTA1 identifies novel gene targets and functions. *PLoS one*. 2011; 6: e17135.
  27. Jackson SP, Durocher D. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Molecular cell*. 2013; 49:795–807.
  28. Goodarzi AA, Jeggo PA. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Advances in genetics*. 2013; 82:1–45.
  29. Dantuma NP, van Attikum H Spatiotemporal regulation of posttranslational modifications in the DNA damage response. *The EMBO journal*. 2016; 35:6–23.
  30. Hay RT. Decoding the SUMO signal. *Biochemical Society transactions*. 2013; 41:463–473.
  31. Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT, Sharrocks AD. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell cycle*. 2003; 2:528–530.
  32. Hendriks IA, Treffers LW, Verlaan-de Vries M, Olsen JV, Vertegaal AC. SUMO-2 Orchestrates Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Cell reports*. 2015; S2211–1247:00179–5.
  33. Hendriks IA, Vertegaal AC. SUMO in the DNA damage response. *Oncotarget*. 2015; 6:15734–15735.
  34. Cann KL, Dellaire G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochemistry and cell biology*. 2011; 89:45–60.
  35. Goodarzi AA, Jeggo PA The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *International journal of molecular sciences*. 2012; 13:11844–11860.
  36. Goodarzi AA, Kurka T, Jeggo PA KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nature structural and molecular biology*. 2011; 18:831–839.
  37. Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nature cell biology*. 2006; 8:870–876.
  38. Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell*. 2008; 31:167–177.
  39. Sarangi P, Zhao X. SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses. *Trends in biochemical sciences*. 2015; 40:233–242.

40. Wei F, Scholer HR, Atchison ML. Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282:21551–21560.
41. Lin KR, Lee SF, Hung CM, Li CL, Yang-Yen HF, Yen JJ. Survival factor withdrawal-induced apoptosis of TF-1 cells involves a TRB2-Mcl-1 axis-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282:21962–21972.
42. Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, Ramsey K, Monte D, Begue A, Tschan MP, Stephan DA, Leprince D. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *The Journal of biological chemistry*. 2009; 284:20927–20935.
43. Zheng J, Wang J, Sun X, Hao M, Ding T, Xiong D, Wang X, Zhu Y, Xiao G, Cheng G, Zhao M, Zhang J, Wang J. HIC1 modulates prostate cancer progression by epigenetic modification. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:1400–1410.
44. Nassour J, Martien S, Martin N, Deruy E, Tomellini E, Malaquin N, Bouali F, Sabatier L, Wernert N, Pinte S, Gilson E, Pourtier A, Pluquet O, et al. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nature communications*. 2016; 7:10399.
45. Boulay G, Malaquin N, Loison I, Foveau B, Van Rechem C, Rood BR, Pourtier A, Leprince D. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:5379–5389.
46. Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, Leprince D. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287:10509–10524.

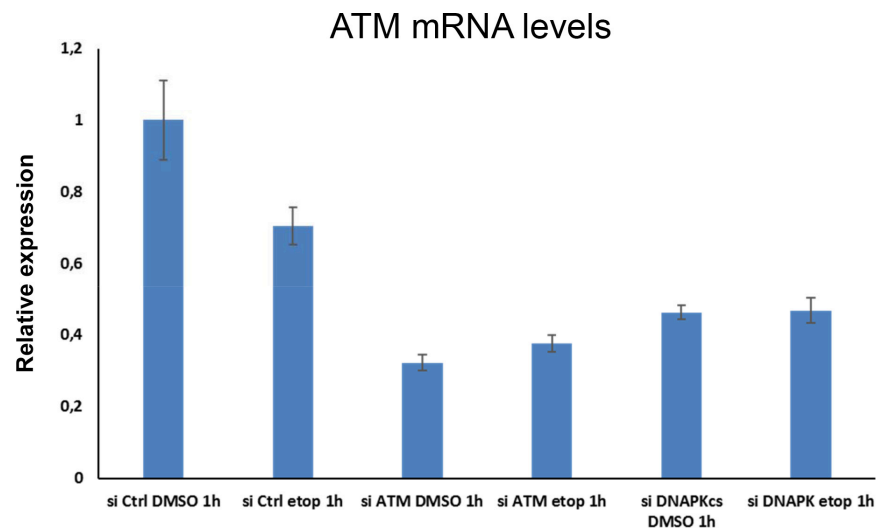


# HIC1 (hypermethylated in cancer 1) SUMOylation is dispensable for DNA repair but is essential for the apoptotic DNA damage response (DDR) to irreparable DNA double-strand breaks (DSBs)

## Supplementary Materials

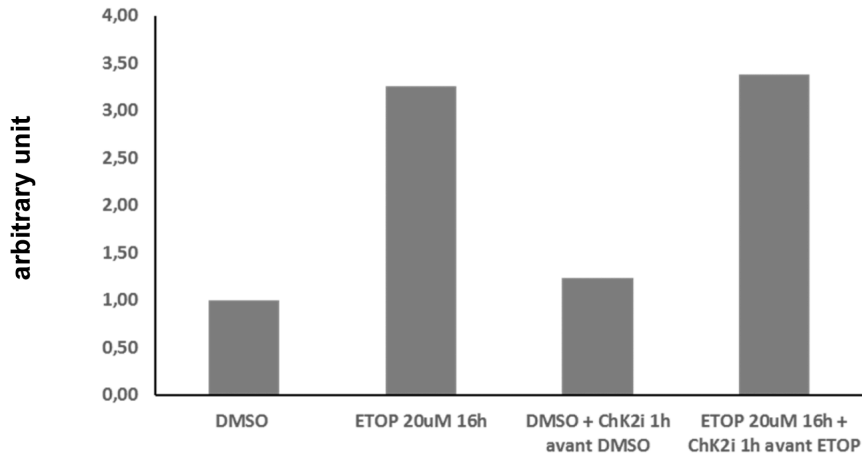


**Supplementary Figure S1: Characterisation of HIC1 SUMOylation upon induction of repairable DSBs (1 hour etoposide treatment) in absence or in presence of an ATM inhibitor.** (A) HEK 293T cells were transfected with FLAG-HIC1 and treated with etoposide or DMSO for 1 hour. Transfected cells were incubated with or without 5 µM of an ATM specific inhibitor (ATMi: KU-55933 also dissolved in DMSO) 1 hour before etoposide treatment, as indicated. Cell extracts were prepared by direct lysis in denaturing conditions and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. The decrease of ATM autophosphorylation on Serine 1681 and of γH2Ax confirms the effectiveness of the ATM inhibitor treatment (Lane 4). (B) Quantification of SUMO-HIC1 to total HIC1 (FLAG) for the experiments presented in the above panel A) was performed with the Fujifilm MultiGauge software. (C) Quantification of SUMO-HIC1 to total HIC1 (FLAG) for the experiment presented in Figure 1, panel C) in the main manuscript was performed with the Fujifilm MultiGauge software.

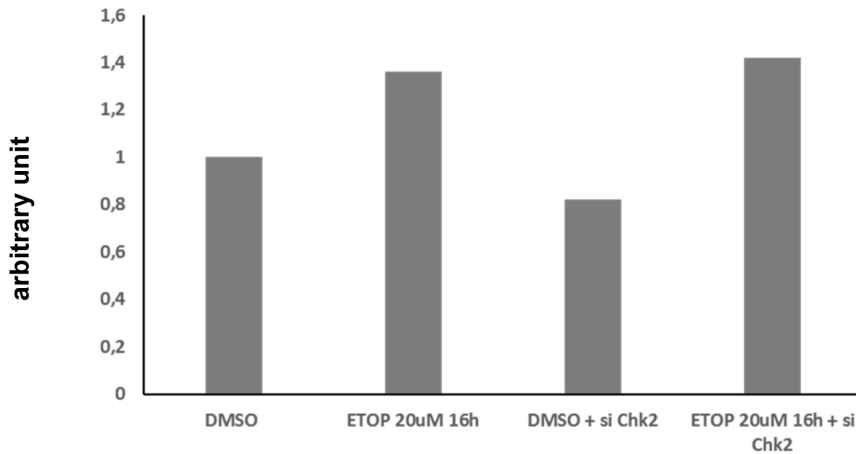


**Supplementary Figure S2: RT-qPCR analyses of ATM expression levels in HEK293T cells treated with etoposide for 16 hours after transfection with HIC1 and the indicated siRNAs.** HEK293T cells were transfected either with nontargeted control siRNA (siCtrl), either with a pool of four siRNAs targeting ATM (siATM) or with a pool of four siRNAs targeting DNAPKcs (siDNAPKcs). The next day, these cells were transfected with a FLAG-HIC1 expression vector for 24 hours and were then treated with 20  $\mu$ M etoposide (+) or mock-treated with DMSO (-) as control for 16 hours. Total RNAs were extracted and RT-qPCR experiments were performed to analyse the expression level of *ATM*.

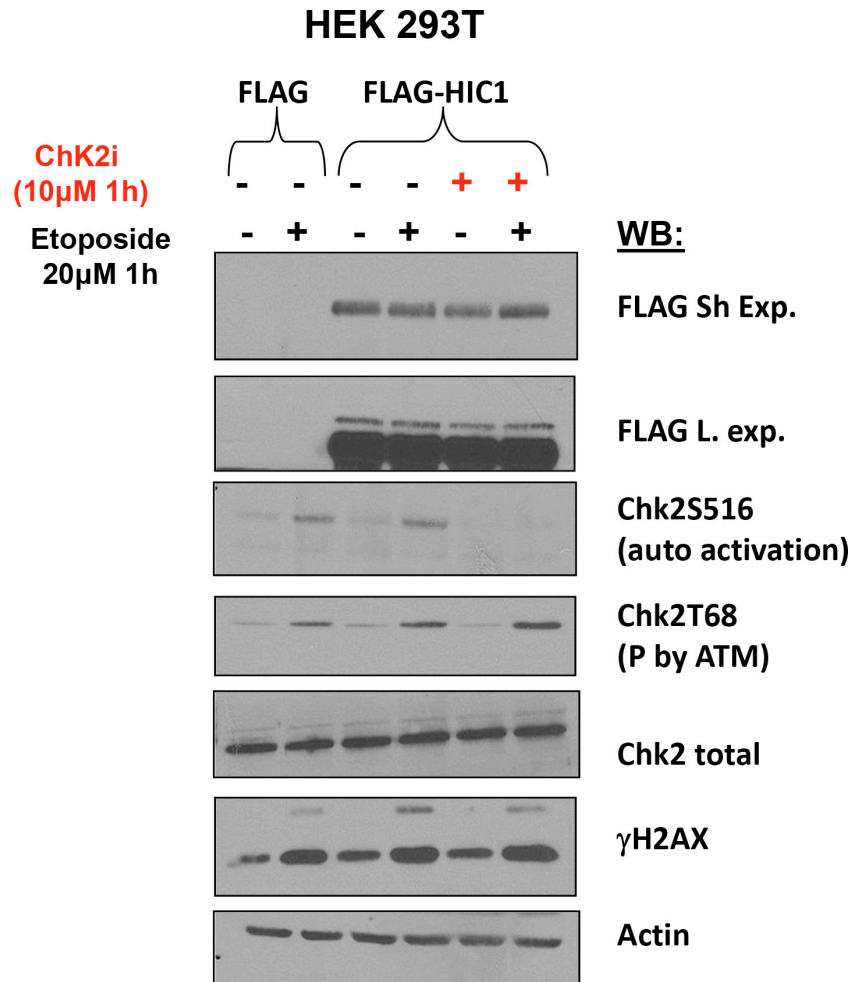
**A** Related to Revised Figure 4A : SUMO quantification relative to FLAG (Multi Gauge)



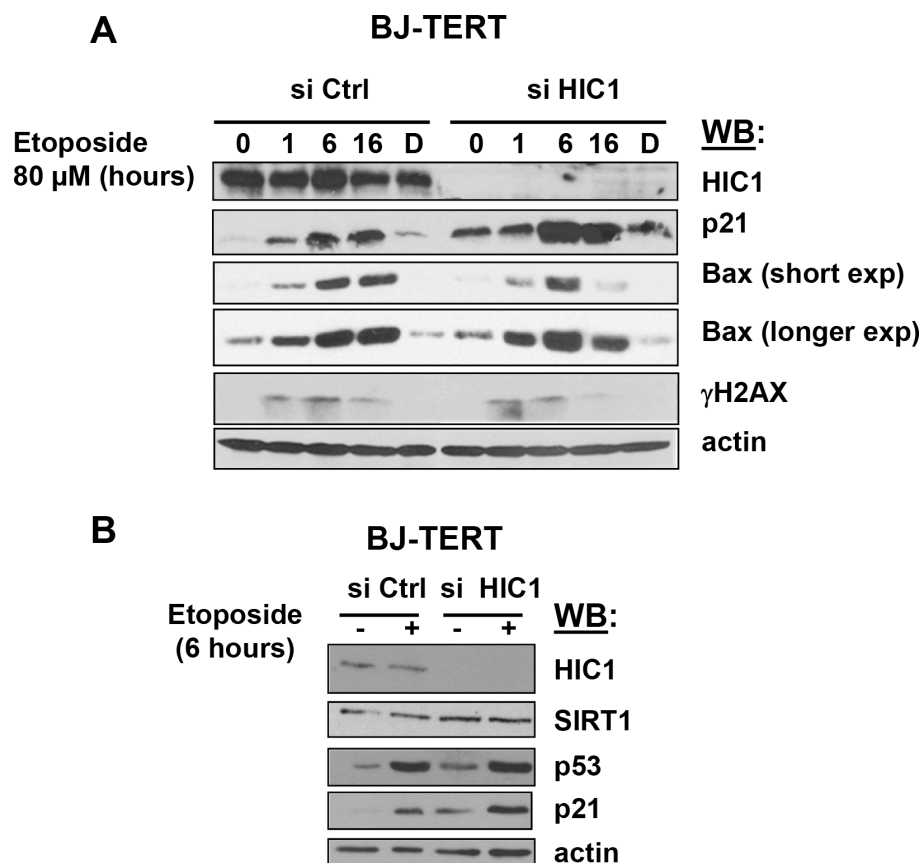
**B** Related to Revised Figure 4C : SUMO quantification relative to FLAG (Multi Gauge)



**Supplementary Figure S3: Characterisation of HIC1 SUMOylation upon induction of irreparable DSBs (16 hours etoposide treatment) after inactivation of Chk2 by pharmacological inhibitors.** Quantification of SUMO-HIC1 to total HIC1 (FLAG) for the experiments performed in presence of Chk2i inhibitor and presented in the manuscript as Figure 4A, lanes 5 to 8, was performed with the Fujifilm MultiGauge software.



**Supplementary Figure S4: The Chk2 inhibitor does not affect HIC1 SUMOylation levels in the presence of repairable DNA double-strand breaks (DSBs) induced by a 1 hour etoposide treatment.** HEK293T cells were transfected with the FLAG and FLAG-HIC1 vectors. 48 hours after transfection, cells were pre-incubated or not with the Chk2 inhibitor (Chk2i) for 1 hour and then with etoposide for 1 hour as indicated. Cell extracts were prepared and Western blotting was performed with the indicated antibodies. γH2AX and actin levels were used as controls for DSB induction and equal loading, respectively.



**Supplementary Figure S5: A 6 hours etoposide treatment is sufficient to induce p21<sup>CIP1</sup> expression in BJ-TERT fibroblasts.** (A) Increased expression of P21<sup>CIP1</sup> after various etoposide treatments. BJ-hTERT fibroblasts were transfected with control siRNAs (siCtrl) or siRNAs targeting HIC1 (siHIC1) for 48 hours before the induction of DSBs by 80  $\mu$ M etoposide treatments of either 1 hour to induce repairable DSBs, of 16 hours to induce a full P53 apoptotic response (Chen et al., 2005) or of 6 hours, as an intermediate time to favor the induction of HIC1 direct target genes whilst limiting the induction of P53 direct target genes. D corresponds to cell treated for 16 hours with vehicle (DMSO) alone. Total cell extracts were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (B) Validation of the cell populations used in the microarrays analyses. BJ-hTERT fibroblasts ( $\times$  100 mm plates) were transfected with siCtrl or siHIC1 and treated for 6 hours with DMSO (-) or etoposide. Total RNAs were extracted for gene expression profiling experiments. As control, aliquots of cells in each condition were directly lysed in Laemmli buffer and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

**Supplementary Table S1: Normalization strategy #1 comparing etoposide vs si-cntrl decreased and si-HIC-etoposide vs si-HIC decreased genes-629 genes.** See Supplementary\_Table\_S1

**Supplementary Table S2: Normalization strategy #2 comparing Etop vs si-cntrl decreased and si-HIC-Etop vs si-cntrl decreased genes-475 genes.** See Supplementary\_Table\_S2

**Supplementary Table S3: Intersection of normalization strategies 1&2-319 genes.**  
See Supplementary\_Table\_S3

**Supplementary Table S4: Sequences of Primers for RT-qPCR**

<b>CHK2</b> forward	CCCCTGGGCTCGATTATG
<b>CHK2</b> reverse	TCCCTCCCAAACCAGTAGTTGT
<b>ATM</b> forward	AGATGATGGGAGGCCTAGGA
<b>ATM</b> reverse	ACAAAGTGTGATGGGGGTGA
<b>HIC1</b> forward	CGACGACTACAAGAGCAGCAGC
<b>HIC1</b> reverse	CAGGTTGTCACCGAAGCTCTC
<b>SIRT1</b> forward	GCGGGAATCCAAAGGATAAT
<b>SIRT1</b> reverse	CACCTAGGACATCGAGGAACTACC
<b>P21</b> forward	GACTCTCAGGGTCGAAAACG
<b>P21</b> reverse	GGCTTCCTCTTGAGAAGATCA
<b>CXCL12</b> forward	AACGCCAAGGTCGTGGTC
<b>CXCL12</b> reverse	GCATGGGCATCTGTAGCTCA
<b>EPHA4</b> forward	ACACGAAAGGGACCTGGCA
<b>EPHA4</b> reverse	CGCATTGCCTGGACACTGCTCA
<b>LPHN2</b> forward	CTCTGGGCATCAAAGGAGCA
<b>LPHN2</b> reverse	CTTTGCAAGCCCATTCCTGC
<b>TGFβR3</b> forward	ACCGTGATGGGCATTGCGTTTGCA
<b>TGFβR3</b> reverse	GTGCTCTGCGTGCTGCCGATGCTGT
<b>TRIB2</b> forward	AGGACGAAGAGAGGACTCGG
<b>TRIB2</b> reverse	CATGCTTGTCGGAGAGGGAA

Sequences of Primers used in the study are provided in the following table.