

Université de Montréal

# **SUMOylation atypique du récepteur nucléaire Nor-1**

par

Jonathan Gagnon

Département de Biochimie et médecine moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences  
en biochimie  
Option cheminement libre

Décembre 2015

© Jonathan Gagnon, 2015

## Résumé

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques. En général, ces récepteurs sont activés par une interaction avec un ligand spécifique, mais leur activité peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles comme la SUMOylation. Notre laboratoire a récemment trouvé que le récepteur des estrogènes ER $\beta$  est une cible de cette modification sur un site de SUMOylation atypique nommé pSuM. Ce site non-consensus se retrouve également sur Nor-1, un récepteur nucléaire impliqué dans une variété de processus physiologiques comme le métabolisme du glucose, la prolifération cellulaire ainsi que la survie neuronale. Pour l'instant, le rôle de ce motif atypique reste inconnu et aucune évidence n'indique que Nor-1 est SUMOylé dans la littérature. Nos objectifs étaient donc de déterminer le potentiel de SUMOylation de Nor-1 sur son pSuM dans un contexte neuronal et de caractériser l'effet de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1 ainsi que l'expression de gènes cibles. Nos résultats ont démontré que Nor-1 peut effectivement être SUMOylé sur son pSuM, que cette SUMOylation est dépendante d'une phosphorylation de la sérine-139 et que la voie des MAPK augmente l'état global de SUMOylation de Nor-1 ainsi que son expression protéique. De plus, les résultats ont indiqués que Nor-1 peut conjuguer deux isoformes de SUMO, soit SUMO-1 et SUMO-2. Les résultats démontrent également que la SUMOylation augmente l'activité transcriptionnelle de Nor-1 et que la SUMOylation de son site pSuM est importante pour le maintien de son activité transcriptionnelle basale. Nos résultats préliminaires suggèrent que la SUMOylation du pSuM de Nor-1 affecte l'expression de gènes cibles comme l'énolase-3 ce qui propose un rôle de la SUMOylation de Nor-1 dans la régulation du métabolisme des neurones. En conclusion, les résultats de ce projet permettent d'identifier un nouveau processus de SUMOylation impliqué dans la régulation des récepteurs nucléaires et de Nor-1 suggérant un rôle de ce processus de SUMOylation atypique dans plusieurs réseaux géniques et processus physiologiques.

**Mots-clés** : récepteurs nucléaires, Nor-1 (NR4A3), SUMOylation, Ubc9, système nerveux central, neurones, énolase-3, pSuM

## **Abstract**

Nuclear hormone receptors are transcription factors that regulate the expression of many genes implicated in a wide variety of physiological functions. They are generally activated by an interaction with a specific ligand but their activity can also be modulated by post-translational modifications such as SUMOylation. Recently, our laboratory identified ER $\beta$  as a SUMOylation target on an atypical SUMOylation motif named pSuM. This non-consensus SUMOylation motif was also found on Nor-1, a nuclear receptor implicated in physiological processes such as glucose metabolism, cellular proliferation and neuronal survival. Until now, the function of this pSuM motif is still unknown and there are no evidence that Nor-1 is a target of SUMOylation. Therefore, the objectives of this work were to determine the SUMOylation potential of Nor-1 on his pSuM in a neuronal context and to characterize the effect of SUMOylation on Nor-1 transcriptional activity and target genes expression. Our results showed that Nor-1 can indeed be SUMOylated on his pSuM, that this SUMOylation was dependent on serine-139 phosphorylation, and that the MAPK pathway augmented the global SUMOylation state of Nor-1 and its protein expression levels. Furthermore, we demonstrated that Nor-1 can conjugate SUMO-1 and SUMO-2. Our results also indicated that SUMOylation activates the transcriptional activity of Nor-1 and that the pSuM site of Nor-1 was important in maintaining its basal transcriptional activity. Preliminary results suggests that Nor-1 SUMOylation on the pSuM has an impact on the expression of target genes such as enolase-3, suggesting a potential role for Nor-1 in the regulation of the metabolism of neurons. In conclusion, the results presented in this work identify a new SUMOylation process implicated in regulating Nor-1 and nuclear receptors activities, suggesting an extended role of this atypical SUMOylation process in many gene networks and physiological processes.

**Keywords:** Nuclear receptors, Nor-1 (NR4A3), SUMOylation, Ubc9, central nervous system, neurons, enolase-3, pSuM

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	xiv
1. Introduction.....	15
1.1 Les récepteurs nucléaires.....	15
1.1.1 Famille des Récepteurs nucléaires et ligands.....	15
1.1.2 Régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.....	16
1.1.2.1 Liaison à des cofacteurs transcriptionnels.....	16
1.1.2.2 Modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires.....	17
1.1.3 Structure commune des récepteurs nucléaires.....	17
1.2 Le récepteur nucléaire Nor-1.....	18
1.2.1 Introduction.....	18
1.2.2 Régulation de l'activité de Nor-1.....	19
1.2.3 Rôles de Nor-1 dans le Système nerveux.....	23
1.2.4 Rôles de Nor-1 dans les autres systèmes.....	29
1.3 Le processus de SUMOylation.....	33
1.3.1 Introduction.....	33
1.3.2 Les motifs de SUMOylation.....	33
1.3.3 Le pSuM, un nouveau site de SUMOylation.....	34
1.3.4 Mécanisme de la SUMOylation.....	36
1.3.5 Effets de la SUMOylation.....	37
1.3.6 La SUMOylation et les maladies neurodégénératives.....	39
1.4 Hypothèses de recherche.....	40
1.5 Objectifs de recherche.....	40
2. Matériel et Méthodes.....	41

2.1 Clonage des vecteurs d'expression et mutagénèse .....	41
2.2 Culture cellulaire.....	42
2.3 Immunoprécipitation et analyse Western blot .....	43
2.4 Essai Luciférase .....	44
2.5 Analyse de PCR quantitative .....	44
2.6 Analyses statistiques .....	45
3. Résultats.....	46
3.1 Nor-1 est une cible de la SUMOylation.....	46
3.2 L'activité transcriptionnelle de Nor-1 est régulée par la conjugaison de SUMO-1 et SUMO-2.....	49
3.3 Le site pSuM de Nor-1 est une cible de SUMOylation qui régule l'activité transcriptionnelle de Nor-1. ....	52
3.4 La voie des MAPK augmente les niveaux protéiques de Nor-1 et son état global de SUMOylation.....	56
3.5 La SUMOylation du pSuM de Nor-1 est importante pour l'expression de gènes cibles.	58
4. Discussion.....	59
4.1 Conclusions et perspectives .....	72
5. Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées lors des réactions d'amplification par PCR pour la mutagénèse dirigée.....	42
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées lors des réactions de PCR quantitative.....	45

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires.</b> .....	18
<b>Figure 2 : Analyse phylogénique et d'homologie des récepteurs hNor-1, hNur77 et hNurr1</b> .....	21
<b>Figure 3 : Représentation de différents motifs de SUMOylation.</b> .....	33
<b>Figure 4 : Modèle de SUMOylation du pSuM de ERβ.</b> .....	35
<b>Figure 5 : Mécanisme de la SUMOylation et de l'ubiquitination</b> .....	37
<b>Figure 6 : SUMOylation du récepteur Nor-1.</b> .....	48
<b>Figure 7 : Conjugaison et régulation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par SUMO-1 et SUMO-2.</b> .....	51
<b>Figure 8 : SUMOylation et régulation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par son pSuM.</b> .....	55
<b>Figure 9 : L'activation de la voie MAPK/Erk augmente l'état global de SUMOylation de Nor-1.</b> .....	57
<b>Figure 10 : La SUMOylation atypique de Nor-1 joue un rôle dans l'induction de ses gènes cibles.</b> .....	59

## Liste des abréviations

%	pourcentage
°C	degré Celsius
2-PG	2-phosphoglycérate
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
3-MT	3-Methoxytyramine
A	alanine
A2M	alpha-2-macroglobulin
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF-1	domaine d'activation 1
AF-2	domaine d'activation 2
ALS	sclérose latérale amyotrophique
AMP	adénosine monophosphate
AMPC	AMP cyclique
AR	récepteur des androgènes
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
ATV	aire tegmentale ventrale
$\beta$ -gal	bêta-galactosidase
CBP	protéine de liaison à CREB
CcnD1	cycline D1
ChIP	essai d'immunoprécipitation de la chromatine
cIAP2	protéine inhibitrice d'apoptose 2
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone



COS-7	cellules de reins de singe
CRE	éléments de réponse à l'AMPC
CREB	protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMPC
CRF	corticolibérine
CRISPR	courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées
CTX0E03	lignée de cellules souches neuronales humaines différenciées
CYP21	21-hydroxylase
D	acide aspartique
DAT	transporteur actif de la dopamine
DBD	domaine de liaison à l'ADN
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DIM	diindolylmethane
DOPAC	acide 3,4-Dihydroxyphenylacétique
DNA-PK	protéine kinase dépendante de l'ADN
DUB	déUbiquitinase
E	acide glutamique
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
ELK-1	protéine contenant un domaine ETS ELK-1
ENO3	énolase-3
ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire
ER $\alpha$	récepteur des estrogènes alpha
ER $\beta$	récepteur des estrogènes bêta
Etc.	Et cætera
EWSR1	protéine liant l'ARN EWS 1
Ex.	Exemple
FAS-L	ligand de FAS

FBS	sérum bovin fœtal
FEN-1	Flap endonucléase 1
FGF-8	facteur de croissance des fibroblastes 8
FXR	récepteur X des farnésoïdes
G6PC	glucose-6-phosphatase
GAL	domaine de liaison à l'ADN du facteur Gal4
GFP	protéine fluorescente verte
GR	récepteur des glucocorticoïdes
GSK-3 $\beta$	glycogène synthase kinase 3 bêta
GTP	guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde
HA	hémagglutinine
HDAC	histone désacétylase
HeLa	cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus
HEK293T	cellules humaines embryonnaires de rein
HIF1 $\alpha$	facteur induit par l'hypoxie 1 alpha
HMR	récepteur nucléaire orphelin (Nur77)
HSF-2	facteur protéine de choc thermique 2
HSP70	protéine de choc thermique 70
HT22	cellules neuronales hippocampique immortalisées de souris
IKK	I $\kappa$ B kinase
I	isoleucine
ICAM-1	molécule d'adhésion intercellulaire 1
IL-1	interleukine 1
INS-1	cellules pancréatiques $\beta$ de rats
IRCM	institut de recherches clinique de Montréal
K	lysine
kDa	kilodalton

LBD	domaines de liaison au ligand
LH	hormone lutéinisante
LEF-1	facteur liant les activateurs des lymphoïdes 1
LXR	récepteurs des oxystérols
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MCF-7	cellules cancéreuses mammaires humaines
MINOR	récepteur nucléaire inductible par les mitogènes
MIP1	protéine inflammatoire des macrophages 1
miR	micro-ARN
mM	millimolaire
MMP	métalloprotéinases
N	asparagine
N10	protéine nucléaire inductible par un facteur de croissance N10 (Nur77)
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	orthovanadate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaF	fluorure de sodium
NAK-1	protéine de réponse précoce NAK-1 (Nur77)
NBRE	élément de réponse à NGFI-B
NCoR	corépresseur de récepteur nucléaire
NDSM	motif de SUMOylation dépendant d'acides aminés chargés négativement
NEM	N-éthylmaleimide
NeuroD1	différenciation neurogène 1
NF-IL-3	facteur nucléaire régulé par l'interleukine 3
NF-κB	facteur nucléaire kappa B
ng	nanogramme
NGF	facteur de croissance des nerfs

NGFI-B	facteur inductible par le facteur de croissance des nerfs B (Nur77)
Nkx6.1	homeobox protein Nkx-6.1
Nor-1	récepteur orphelin dérivé des neurones
NR3B1	membre 1 du groupe B de la sous-famille 3 des récepteurs nucléaires
NR4A	groupe A de la sous-famille 4 des récepteurs nucléaires
NR4A1	membre 1 du groupe A de la sous-famille 4 des récepteurs nucléaires
NR4A2	membre 2 du groupe A de la sous-famille 4 des récepteurs nucléaires
NR4A3	membre 3 du groupe A de la sous-famille 4 des récepteurs nucléaires
Nur	sous-famille 4 des récepteurs nucléaires
Nur77	récepteur nucléaire hormonal NUR/77
Nurr1	protéine reliée aux récepteurs nucléaires 1
NurRE	élément de réponse aux Nur
P	proline
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	tampon phosphate salin
PC12	cellules dérivées d'une tumeur neuroendocrine de la médulla adrénal du rat
PCAF	facteur associé à P300/CBP
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PDSM	motif de SUMOylation phospho-dépendant
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK4	pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4
Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PEI	polyéthylimine
PEP	phosphoénolpyruvate
pH	potentiel hydrogène
PIAS	inhibiteur de protéine de STAT activée

PIN-1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting
PML	protéine de leucémie promyélocytique
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
POMC	pro-opiomélanocortine
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
PR	récepteur de la progestérone
pSuM	motif de SUMOylation phosphorylé
PXR	pregnane X receptor
R	arginine
RAN	ras-related nuclear protein
RanBP2	protéine de liaison à RAN
RANGAP1	protéine activatrice de la GTPase de RAN
ROR $\alpha$	récepteur apparenté au récepteur des rétinoïdes alpha
RSK	kinase ribosomale S6
RXR $\alpha$	récepteur X des rétinoïdes alpha
S	sérine
SAE	enzyme activatrice de SUMO
SDS	dodécylsulfate de sodium
SEM	erreur standard de la moyenne
SENP	sentrin/SUMO-specific protease
SIM	motif d'interaction avec la SUMOylation
SIX3	homeobox protein SIX3
SLC2A2	transporteur de glucose 2
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
SN	substance noire
SOD1	Superoxide dismutase 1
SRC	coactivateur des récepteurs stéroïdiens
SREBP	protéine liant l'élément de réponse des stérols

SUMO	small ubiquitin-like modifier
T	thréonine
T/C-28	cellules chondrocyte humaines immortalisées
TAFII68	TATA-binding protein-associated factor II 68
TEC	transloqué dans le chondrosarcome extrasquelettique
TGD	ADN glycosylase spécifique aux discordances G/T
THPN	1-(3,4,5-trihydroxyphenyl)nonan-1-one
THP-1	cellules macrophages humaines
TIF1 $\beta$	facteur de transcription intermédiaire 1 $\beta$
TMPA	ethyl [2,3,4-trimethoxy-6-(i-octanoyl)phenyl]acetate
TR3	récepteur testiculaire 3 (Nur77)
TRAIL	ligand inducteur d'apoptose apparenté au TNF
TRAP220	complexe protéique de 220 kDa associé au récepteur des hormones thyroïdiennes
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
UAS	séquence d'activation en amont
ub	ubiquitine
Ubc9	enzyme de conjugaison à l'ubiquitine 9
$\mu$ g	microgramme
$\mu$ l	microlitre
UPC1	protéine découplante 1
VCAM-1	molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1
VEGF	facteur de croissance endothélial vasculaire
VHL	suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau
X	acide aminé quelconque
$\psi$	aminé hydrophobe
YFP	protéine fluorescente jaune

## **Remerciements**

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de recherche, André Tremblay pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, accordé sa confiance, sa patience ainsi que pour son aide précieuse tout au long de ma maîtrise.

Je remercie également mes collègues de laboratoire soit Alexandre Kuftejian, Lydia Edjekounae, Samira Benhadjeba, Stéphanie Bilodeau et Véronique Caron pour avoir répondu à mes questions ainsi que l'aide, les conseils et le soutien moral qu'ils m'ont apporté pendant ces deux années.

Je remercie bien sûr mes parents pour m'avoir soutenu et encouragé du début de mon parcours scolaire jusqu'à ce jour.

# 1. Introduction

Ce mémoire portera sur le récepteur nucléaire Nor-1 et en particulier sur son potentiel à être modifié par la SUMOylation. Les mécanismes de régulation de l'activité de Nor-1 seront décrits en détail ainsi que ses rôles au niveau du système nerveux central et de façon plus brève dans les autres systèmes. Le processus de SUMOylation, ses effets généraux au niveau cellulaire et dans l'intégrité neuronale seront également définis. Plus particulièrement, le projet porte sur le potentiel de SUMOylation de Nor-1 sur son site pSuM, un motif de conjugaison atypique de SUMO nouvellement identifié au laboratoire. Le rôle de cette SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1 va être déterminé.

## 1.1 Les récepteurs nucléaires

### 1.1.1 Famille des Récepteurs nucléaires et ligands

Il existe plusieurs classes de récepteurs impliqués dans la transmission des divers signaux au niveau de la cellule pour déclencher ou supporter une réponse physiologique. En particulier, les récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires contrôlent plusieurs aspects d'homéostasie en physiologie humaine. Les récepteurs nucléaires agissent directement au niveau de l'ADN pour contrôler l'expression des gènes impliqués dans divers processus physiologiques, ce qui en fait des facteurs de transcription. Ces récepteurs sont divisés en sept sous-familles (sous-familles 0 à 6) qui sont elles-mêmes divisées en plusieurs groupes et ces divisions servent de nomenclature pour nommer les récepteurs nucléaires (1, 2). Par exemple, le récepteur nucléaire des estrogènes ER $\alpha$  faisant partie du groupe B de la troisième sous-famille peut également être appelé NR3B1 (2). Environ la moitié de ces récepteurs ont un ligand connu et identifié dont la nature est très variée. Par exemple, un ligand peut être une hormone stéroïdienne comme l'estrogène pour le récepteur des estrogènes, ou encore la progestérone dans le cas du récepteur de la progestérone. Les ligands peuvent également être sous forme de lipide comme les acides gras pour le récepteur PPAR ou les oxystérols pour le récepteur LXR (1). Le mécanisme d'activation des récepteurs requiert l'interaction avec le ligand pour permettre selon le cas soit une homodimérisation, comme dans le cas des récepteurs stéroïdiens, ou encore une hétérodimérisation avec un partenaire commun, comme le récepteur



X des rétinoïdes (RXR) (1). Ce processus d'activation apporte la conformation nécessaire aux récepteurs pour interagir de façon spécifique avec l'ADN afin de favoriser la transcription et l'expression des gènes cibles. Pour certains récepteurs, comme le récepteur des glucocorticoïdes, l'interaction avec le ligand favorise la relâche de protéines chaperonnes, telle que HSP70, permettant la translocation du récepteur vers le noyau de la cellule (3). D'autre part, une majorité des récepteurs nucléaires sont encore considérés comme récepteurs orphelins, c'est-à-dire qu'aucun ligand endogène n'a été identifié pour ceux-ci jusqu'à ce jour. Dans cette catégorie, il est proposé pour certains récepteurs que leur mécanisme d'activation dépend de leur expression respective, suggérant une activité constitutive ne nécessitant pas de ligand. C'est justement le cas pour le récepteur d'intérêt de ce mémoire, c'est-à-dire le récepteur nucléaire Nor-1 qui sera discuté en détail un peu plus loin (voir section 1.2) (4).

## **1.1.2 Régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires**

### **1.1.2.1 Liaison à des cofacteurs transcriptionnels**

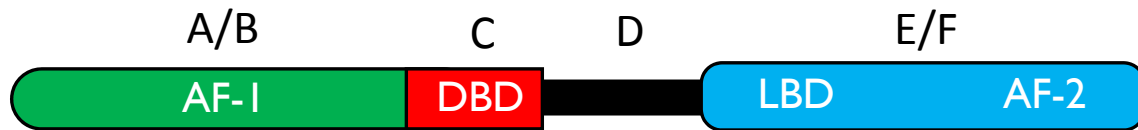
Comme discuté précédemment, les récepteurs nucléaires sont activés dans certains cas par des ligands ou peuvent posséder une activité constitutive, mais dans ces deux cas, l'activation des récepteurs requiert la présence de cofacteurs transcriptionnels pour diriger l'expression des gènes cibles. En effet, le potentiel transcriptionnel des récepteurs nucléaires nécessite le recrutement de cofacteurs pouvant être soit des coactivateurs transcriptionnels dans les cas d'activation de l'expression génique ou des corépresseurs pour maintenir un état répressif de transcription. Ces cofacteurs permettent en général d'assurer les modifications nécessaires au niveau de la chromatine et d'interagir avec la machinerie basale de transcription de l'ARN polymérase II. En effet, parmi les coactivateurs recrutés, on retrouve la protéine de liaison à CREB (CBP)/p300 qui possèdent une activité d'acétylation des histones permettant ainsi de décondenser la chromatine, rendant plus accessible les régions promotrices des gènes (5). D'autre part, le corépresseur comme NCoR permet de recruter les histones déacétylases (HDAC) qui maintiennent la chromatine dans un état condensé et donc peu accessible pour la transcription (6).

### 1.1.2.2 Modifications post-traductionnelles des récepteurs nucléaires

Il est connu que l'activité de la plupart, sinon de tous, les récepteurs nucléaires est dépendante des modifications post-traductionnelles. Plusieurs types de modifications ont été décrites pour ces récepteurs, par exemple la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination et la SUMOylation (7-9). Ces modifications post-traductionnelles ont en général des effets divers sur l'activation des récepteurs, leur inhibition, leur dégradation, leur localisation cellulaire, le recrutement de cofacteurs, etc. L'effet de ces modifications est donc très variable et identifie les récepteurs nucléaires comme cibles de plusieurs voies de régulation cellulaire. Ce mémoire portera en particulier sur le rôle de la SUMOylation du récepteur Nor-1 (voir section 1.3).

### 1.1.3 Structure commune des récepteurs nucléaires

Chaque membre de la superfamille des récepteurs nucléaires possède une structure générale commune comprenant plusieurs domaines fonctionnels distincts permettant leur activité (**Figure 1**) (10). Le domaine C de liaison à l'ADN (DBD) est le domaine le plus conservé parmi les récepteurs nucléaires. Le domaine DBD permet aux récepteurs d'interagir directement avec l'ADN, soit sur des éléments de réponse spécifiques contenus dans les promoteurs des gènes cibles au moyen d'une structure formée de deux doigts de zinc dans une configuration nécessitant la présence de 4 résidus cystéines (C4) coordonnant la présence d'un ion zinc pour chaque doigt. La portion C-terminale (E/F) contient les domaines de liaison au ligand (LBD) et d'activation 2 (AF-2) qui sont directement impliqués dans la réponse transcriptionnelle des récepteurs par leur ligand. Le domaine de liaison au ligand est formé d'une cavité hydrophobe permettant d'accueillir le ligand et d'activer le domaine AF-2 en favorisant le déplacement de l'hélice #12 pour le recrutement de coactivateurs transcriptionnels (10, 11). La région du centre (D) correspond à la région charnière (hinge) qui permet une certaine flexibilité des récepteurs en plus d'influencer leur localisation cellulaire. Enfin, le domaine d'activation 1 (AF-1) situé dans la portion N-terminale (A/B) représente la portion la plus variable entre les différents récepteurs nucléaires. L'AF-1 permet une activation transcriptionnelle distincte de l'AF-2, c'est-à-dire indépendante de la présence du ligand, mais dépendante de modifications post-traductionnelles permettant le recrutement de cofacteurs.



**Figure 1 : Structure générale des récepteurs nucléaires.**

Représentation schématique de la structure des récepteurs nucléaires avec les différentes régions fonctionnelles indiquées soit : le domaine d'activation 1 (AF-1), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière (hinge), le domaine de liaison du ligand (LBD) et le domaine d'activation 2 (AF-2).

## 1.2 Le récepteur nucléaire Nor-1

### 1.2.1 Introduction

Nor-1 fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires décrite en détail plus haut (section 1.1). Plus précisément, Nor-1 est le troisième membre du groupe A de la sous-famille 4 (NR4A) des récepteurs nucléaires (**Figure 2**). Le premier membre de cette famille est le facteur de croissance neuronal 1B, plus communément appelé Nur77, mais qui porte aussi les noms NR4A1, NGF1-B, HMR, NAK-1, N10, et TR3 (12, 13). Le deuxième membre est le récepteur NR4A2/Nurr1 (14) et finalement Nor-1 qui porte également les noms NR4A3, MINOR, TEC et CHN (15) est le troisième membre. Les récepteurs de la famille NR4A, également appelée Nur, sont considérés comme récepteurs nucléaires orphelins, c'est-à-dire que leur ligand endogène, s'il existe, reste encore inconnu. Ces récepteurs sont encodés par des gènes à induction précoce, c'est-à-dire des gènes activés rapidement après l'arrivée d'un stimulus (16). La découverte de Nor-1 s'est faite en 1994 à partir de cultures primaires de cellules neuronales de rat, ce qui lui a valu le nom de "Neuron derived orphan receptor 1" ou Nor-1 (15). Il existe trois isoformes de Nor-1, soit l'isoforme correspondant au récepteur complet et actif, l'isoforme correspondant à un récepteur tronqué en région C-terminale où une portion du LBD est manquante et l'isoforme correspondant au récepteur tronqué de 30 acides aminés en région N-terminale (17, 18). Depuis, plusieurs études se sont penchées sur le rôle de Nor-1, en particulier au niveau du système nerveux central. En effet, pendant le développement

embryonnaire, Nor-1 est exprimé dans certaines structures du système nerveux central en particulier dans le néocortex et la moelle épinière (19). En plus du système nerveux central, le profil d'expression de l'ARNm de Nor-1 révèle une localisation au niveau du système endocrinien et du système reproducteur (20). Nor-1 apparaît également quoiqu'à des niveaux plus bas dans les systèmes respiratoire et circulatoire ainsi que dans les muscles, mais semble absent du système digestif (20). Avec ce profil d'expression, il n'est donc pas surprenant qu'une panoplie de rôles soit attribuée à Nor-1, en particulier dans plusieurs procédés de régulation du métabolisme énergétique, dans le processus de guidance et survie neuronale, la stéroïdogenèse, et l'inflammation (21-23).

## **1.2.2 Régulation de l'activité de Nor-1**

### **1.2.2.1 Liaison à l'ADN et dimérisation**

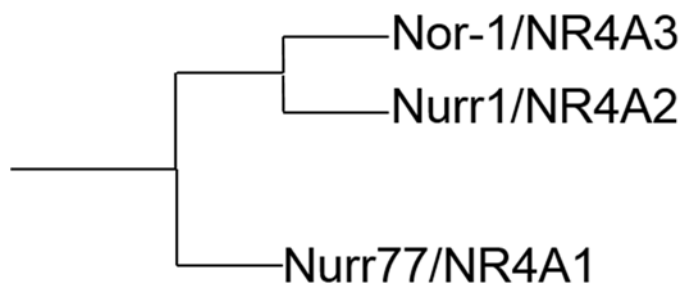
Comme mentionné, Nor-1 partage beaucoup d'homologie de structure avec les autres membres de la famille NR4A (**Figure 2A et 2B**). En particulier, la séquence en acides aminés du domaine DBD est hautement conservée (92-97%) avec les récepteurs Nurr1 et Nur77 (**Figure 2B**). D'ailleurs, cette forte homologie du domaine DBD permet aux trois récepteurs de partager un profil d'interaction à l'ADN similaire. En effet, ils peuvent associer l'ADN en configuration monomérique sur un élément de réponse NBRE (élément de réponse à NGFI-B), qui consiste en un élément de réponse simple (demi-site) dont la séquence est AAAGGTCA (24, 25). Les récepteurs peuvent également lier l'ADN sous forme d'homodimères (ex. : deux protéines Nor-1) ou d'hétérodimères (ex. : dimère entre Nor-1 et Nur77) sur un élément NurRE (élément de réponse aux Nur/NR4A), qui consiste en un élément de réponse formé de deux demi-sites à répétition inversée. L'élément NurRE a été initialement découvert dans le promoteur du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC) et la séquence est TGATATTTacctcAAATGCC (26, 27). De plus, les récepteurs de la famille de Nor-1 peuvent former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur des rétinoïdes RXR (26, 28). Par contre, Nor-1 ne peut pas s'hétérodimériser avec RXR, mais il a été démontré que le récepteur des glucocorticoïdes (GR) peut interférer avec Nor-1, Nur77 et

Nurr1, résultant en une inhibition de leur activité transcriptionnelle ce qui suggère la possibilité que Nor-1 puisse hétérodimériser avec d'autres récepteurs nucléaires et donc interférer dans plusieurs processus biologiques par ce mécanisme (19, 28, 29).

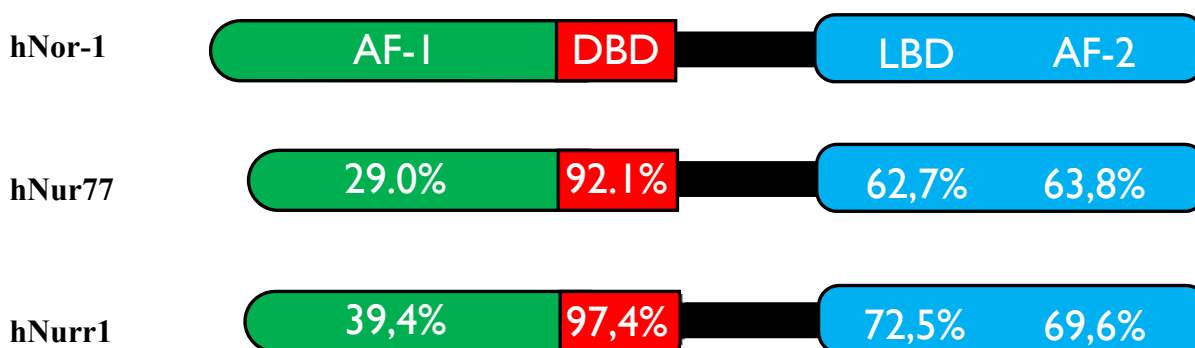
### 1.2.2.2 Régulation par le domaine de liaison au ligand

Les domaines de liaison au ligand (LBD) et d'activation 2 (AF-2) situés en région C-terminale (**Figure 1**) sont directement impliqués dans la réponse transcriptionnelle des récepteurs nucléaires par leur ligand. Cependant, dans le cas de Nor-1 et des membres de la famille NR4A, les ligands potentiels ne sont toujours pas connus, définissant ces récepteurs comme orphelins. En effet, les structures cristallographiques du domaine de liaison du ligand de Nur77 et de Nurr1 indiquent un remplacement de la cavité qui accueille habituellement le ligand par une série de résidus hydrophobes encombrant le site normalement utilisé par le ligand (4, 30). Ces mêmes études montrent également que ces récepteurs ont une activité constitutive en rapport avec la stabilisation du domaine LBD (4, 30). Ces domaines étant assez bien conservés entre les récepteurs de la famille NR4A (63-72%; **Figure 2B**), de même que la position des acides aminés hydrophobes du domaine LBD de Nurr1 qui est similaire à celle de Nor-1, cela suggère que Nor-1 puisse être activé également de façon constitutive (4). Cependant, une étude a récemment démontré que la prostaglandine A2 pourrait lier le domaine LBD de Nor-1 et agir comme transactivateur de Nor-1, identifiant un ligand potentiel de Nor-1 (31). Il est intéressant de noter que pour Nur77, certains composés synthétiques ou même naturels ont été décrits comme ligands potentiels. Par exemple, le métabolite fongique cytosporone B ainsi que le composé chimique 1-(3,4,5-trihydroxyphenyl)nonan-1-one (THPN) sont des agonistes pouvant se lier au LBD de Nur77 (32, 33). Il y a également des composés agissant comme antagonistes de Nur77 soit : ethyl [2,3,4-trimethoxy-6-(*i*-octanoyl)phenyl]acetate (TMPA) et les analogues du Diindolylmethane (ex : DIM-C-*p*PhOH) (33-37). Par contre, ces composés ne semblent pas avoir été testés sur Nor-1, mais ces études indiquent toutefois que malgré une configuration atypique du LBD des récepteurs de la famille des NR4A, il semble que ces récepteurs puissent lier des ligands potentiels.

A



B



**Figure 2 : Analyse phylogénétique et d'homologie des récepteurs hNor-1, hNur77 et hNurr1**

**A.** Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires humains de la famille NR4A (adapté de *Bookout et al*(20)). **B.** Analyse d'homologie entre les membres de la famille de récepteurs nucléaires humains NR4A. Les pourcentages sont exprimés par rapport à Nor-1 et calculés selon la séquence en acides aminés (38).

### 1.2.2.3 Régulation par l'expression du récepteur

Puisque les récepteurs de la famille NR4A ont une activité constitutive et sont encodé par des gènes à induction précoce, leur niveau d'expression devient un facteur important pour la régulation de leur activité transcriptionnelle. Parmi les inducteurs de l'expression de Nor-1 décrits, on retrouve des facteurs de croissance, la forskoline, le stress et l'angiotensine II (16, 23, 39, 40). En particulier, il a été démontré que l'expression de Nor-1 est augmentée par le facteur de croissance des nerfs (NGF) dans les cellules PC12 (ligné dérivée d'une tumeur neuroendocrine de la médulla adrénal du rat), par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) dans les cellules de muscles lisses vasculaires (41-43). Outre ces facteurs de croissance, l'expression de Nor-1 peut

également être augmentée par des cytokines comme l'interleukine 1 (IL-1) dans les fibroblastes, par une stimulation de la voie bêta adrénargique dans les muscles squelettiques, par surexpression du facteur de transcription Nkx6.1 dans les cellules bêta du pancréas et même par une agitation mécanique (44-47). Il est à noter que la plupart des stimuli activant l'expression de Nor-1 favorisent la production d'AMP cyclique (AMPc), suggérant la participation du facteur de transcription CREB (protéine liant l'élément de réponse de l'AMPc) dans la régulation de l'expression de Nor-1. En effet, trois éléments de réponse à l'AMPc (CRE) ont été identifiés dans le promoteur de Nor-1, permettant ainsi d'augmenter l'expression de Nor-1 (39). Un article récent a également démontré l'importance de l'état d'acétylation des histones dans l'expression du récepteur puisque'une déplétion des histones désacétylases HDAC1 et HDAC3 favorisait une augmentation de l'expression de Nor-1 (48). En somme, l'expression de Nor-1 semble être régulée par divers stimuli en fonction du contexte cellulaire.

#### **1.2.2.4 Régulation par des cofacteurs**

Plusieurs coactivateurs transcriptionnels ont été décrits dans le processus d'activation des récepteurs nucléaires de la famille NR4A pour potentialiser la transcription des gènes. En effet, il a été démontré que les trois récepteurs pouvaient recruter les coactivateurs de la famille des p160/SRC (steroid receptor coactivator), ainsi que p300/CBP et l'isomérase PIN-1, entraînant en une augmentation de leur activité respective (49, 50). Nor-1 peut également interagir avec les coactivateurs suivants : le complexe protéique de 220 kDa associé au récepteur des hormones thyroïdiennes (TRAP220), le facteur associé à P300/CBP (PCAF), le facteur de transcription intermédiaire 1 $\beta$  (TIF1 $\beta$ ) et avec un corépresseur étant le deuxième membre de la sous-famille de protéine avec quatre et demi domaines LIM (domaine retrouvé dans les protéines Lin11, Isl-1 et Mec-3) soit FHL2 (51-54). De plus, Six3, un facteur de transcription impliqué dans le développement du cerveau antérieur et des yeux, peut agir en tant que coactivateur de Nor-1 dans les chondrocytes T/C-28 ou comme corépresseur de Nor-1 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, démontrant ainsi une spécificité d'action selon le tissu dans lequel l'interaction se produit (55, 56).

#### **1.2.2.4 Régulation par des modifications post-traductionnelles**

Pour la majorité des récepteurs nucléaires, le domaine AF-1 est la cible de modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation, la SUMOylation et l'ubiquitination, permettant de réguler leur activité transcriptionnelle. Plusieurs de ces modifications ont été identifiées pour Nur77 et Nurr1 et leurs effets ont été caractérisés sur ces récepteurs (57). Pour Nor-1, la phosphorylation des résidus sérine-366, -376, -526 et -538, et des tyrosine-8 et -26 a été décrite par analyse de type western ou spectrométrie de masse, quoique leur rôle respectif reste encore inconnu (58-60). Également, le rôle de la méthylation sur l'arginine-189 ainsi que de l'acétylation (résidu non identifié) reste aussi non caractérisé (61, 62). De façon similaire, Nor-1 a été identifié comme cible de phosphorylation *in vitro* par la kinase ERK-2 (résidu non identifié), ainsi que par la kinase RSK (377) dans les cellules HEK-293, mais aucun rôle de ces phosphorylations n'a été décrit (58, 60). Il a été démontré que la kinase DNA-PK peut phosphoryler Nurr1 sur la sérine-377 contenu dans un site consensus de phosphorylation de DNA-PK qui est conservé pour Nor-1 et que la mutation de cette sérine affecte négativement la réparation des brisures d'ADN double brin dans les cellules HEK-293 (63). Un autre fait intéressant est que la 6-mercaptopurine active Nor-1 et l'un des mécanismes proposés est une régulation de la phosphorylation de l'AF-1 de Nor-1 (51). Il est à noter qu'il n'y a jusqu'à présent aucune indication de SUMOylation pour Nor-1, mais qu'il y en a pour Nurr1 soit sur les lysines 91, 558 et 576 (64, 65), suggérant la forte possibilité que Nor-1 puisse être une cible fonctionnelle de SUMOylation. De plus, notre laboratoire a identifié un nouveau site non-consensus de SUMOylation pour le récepteur des estrogènes (7), dont la séquence consensus est conservée pour Nor-1. L'élucidation du rôle de la SUMOylation sur la fonction de Nor-1 est proposée dans ce travail.

### **1.2.3 Rôles de Nor-1 dans le Système nerveux**

#### **1.2.3.1 Nor-1 et le développement du système nerveux**

Les récepteurs NR4A semblent très impliqués dans le développement du système nerveux, en particulier au niveau du système dopaminergique (voir section 1.2.3.2) et dans la différenciation des cellules neuronales en réponse au facteur de croissance neuronal (13, 66). Il y a donc plusieurs évidences démontrant que Nor-1 régule le développement du système



nerveux central. En effet, le gène codant pour Nor-1 est exprimé très tôt lors du développement chez la souris, soit au jour 7 (E7) de la période embryonnaire (67). Une étude histologique chez la souris invalidée (KO) pour Nor-1 de l'équipe de O. Conneely à Baylor a démontré l'importance de Nor-1 dans la guidance et la croissance axonale ainsi que la survie des cellules pyramidales de l'hippocampe lors du développement (22). De plus, une sensibilité accrue aux attaques épileptiques a également été rapportée chez la souris adulte KO pour Nor-1 (22). Une autre étude utilisant le même modèle de souris KO a démontré un comportement indirect bidirectionnel associé à un rétrécissement des canaux semi-circulaires de l'oreille interne et par le fait même l'importance de Nor-1 dans la croissance de ces canaux (68). Par contre, l'équipe de A. Winoto à Berkeley ayant également généré un modèle de souris KO pour Nor-1 a observé une mort embryonnaire due à des défauts de développement au niveau de la gastrula, une étape importante dans la formation de l'embryon (69). Les auteurs expliquent cette divergence avec les travaux de Conneely par une délétion plus grande de l'AF-1 de Nor-1 ainsi qu'une délétion de la moitié du domaine de liaison à l'ADN de leur souris KO (69). En effet, le modèle de l'équipe de Winoto permet d'abolir complètement l'action de Nor-1 au niveau de l'ADN avec la délétion du domaine DBD, incluant une partie de l'AF-1 et du LBD, contrairement au modèle de Conneely où seul le domaine AF-1 de Nor-1 est délété. Les résultats de Conneely restent tout de même intéressants puisqu'ils démontrent l'implication de Nor-1 dans la guidance neuronale et la formation de l'oreille interne. Avec le rôle potentiel de l'AF-1 dans ces processus, on peut envisager une contribution de certaines modifications post-traductionnelles et/ou recrutement de cofacteurs au niveau de l'AF-1 dans la régulation de ces phénomènes. Un article récent présente Nor-1 comme une cible des micro-ARN hsa-miR-7, hsa-miR-302a et miR-17 dans les cellules CTX0E03, une lignée de cellules souches neuronales humaines différenciées, proposant ainsi une régulation possible de Nor-1 et de son implication dans le développement neuronal par des micro-ARNs (70). De plus, l'importance de Nor-1 dans le développement du système nerveux est supportée par son association avec la protéine Six3 (56). En effet, trois mutations de Six3 sont associées à l'holoprosencéphalie, un défaut de développement des hémisphères du cerveau, et l'une d'elles empêche l'interaction avec Nor-1 (71). Un autre article récent propose une implication de Nor-1 dans la neurogénèse adulte au niveau du gyrus denté puisque Nor-1 est très exprimé dans cette structure et qu'il est co-exprimé avec la Nestine un marqueur des cellules précurseurs neuronales en prolifération dans l'hippocampe (72, 73). Par contre, il est à

noter que ce rôle est proposé sur la base d'analyses bio-informatiques et qu'il doit être validé *in vivo* (73).

### **1.2.3.1 Nor-1, stress, régulation de la dopamine et santé mentale**

Tous les membres de la famille de Nor-1 sont exprimés au niveau du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, de l'hypophyse et de la glande surrénale, soient les trois composantes de l'axe endocrinien hypothalamo-hypophyso-surrénalien (57). Des travaux effectués dans diverses lignées cellulaires, chez la souris ou sur du tissu humains ont démontré que l'expression des récepteurs NR4A semble généralement augmentée dans ces structures en réponse au stress (57). Il est de plus proposé que Nur77 et Nurr1 régularaient l'expression de la corticolibérine (CRF) au niveau de l'hypothalamus et de la proopiomélanocortine (POMC) au niveau de l'hypophyse, menant à la sécrétion d'ACTH nécessaire pour l'activation de la glande surrénale et la production des glucocorticoïdes (23, 74, 75). De plus, Nur77 et Nor-1 régulent l'expression de CYP21 et de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) au niveau de la glande surrénale, deux enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse et la formation des glucocorticoïdes comme le cortisol dans la réponse au stress (76). Il est également intéressant de noter que les glucocorticoïdes réduiraient l'activité des récepteurs NR4A dans les tissus de l'axe de par l'interaction du récepteur des glucocorticoïdes GR avec les trois membres de la famille afin de réprimer leur activité respective dans un processus de régulation (*feedback*) négative caractéristique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (29, 75, 77).

Pour ce qui est de la transmission dopaminergique, Nor-1 et Nur77 sont exprimés dans les neurones GABAergiques réceptifs à la dopamine du noyau accumbens et du striatum où un signal dopaminergique augmente leur expression respective (78-82). Une étude sur des souris KO pour Nur77 a démontré une sensibilité accrue à l'agoniste quinpréole du récepteur de la dopamine D<sub>2</sub> chez ces souris suggérant ainsi un rôle de Nur77 dans la signalisation dopaminergique (83). La même étude démontre également une implication de Nur77 dans le métabolisme de la dopamine par une augmentation du métabolite DOPAC qui est expliquée par une augmentation de l'expression tyrosine hydroxylase impliquée dans la synthèse de la dopamine et une diminution de l'expression de la catéchol-O-méthyltransférase qui métabolise la dopamine en 3-MT au lieu du DOPAC (83). Nurr1 pour sa part est exprimé dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) et de l'aire tegmentale ventrale (ATV)

contrairement à Nur77 et Nor-1 qui ne le sont pas de manière basale (57). Nurr1 semble important pour la différenciation de ces neurones et le maintien de leurs activités. En effet, une étude menée sur des souris Nurr1 KO a déterminé une absence de différenciation des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale (66). Une autre étude avec des souris Nurr1 KO a identifié une absence de marqueurs dopaminergiques tels que la tyrosine hydroxylase et le transporteur de dopamine (DAT) à la naissance et dans une autre étude l'expression des mêmes marqueurs était diminuée lorsque l'on retirait Nurr1 de souris mature nuisant ainsi au maintien des neurones dopaminergiques (84-86). Un fait intéressant est qu'un traitement à l'halopéridol (antagoniste D<sub>2</sub>) chez des souris augmentait rapidement (après 1h) les niveaux d'expression de Nur77 et Nor-1 dans l'ATV et subséquemment (après 4h) une augmentation de l'expression d'enzymes impliqués dans la synthèse (tyrosine hydroxylase) et le transport (DAT) de la dopamine, proposant ainsi une régulation de ces gènes par Nor-1 et un rôle dans la signalisation dopaminergique pour celui-ci (87). En somme, Nor-1 et Nur77 semblent avoir un profil d'expression et des fonctions redondantes au niveau de la signalisation dopaminergique, tandis que Nurr1 semble plus impliqué dans le développement et le maintien des neurones dopaminergiques.

Comme mentionné précédemment (page 26), les récepteurs Nor-1 et Nur77 sont exprimés dans certaines structures du circuit de motivation et de récompense relié au système dopaminergique, tel que le striatum, le noyau accumbens, et le cortex préfrontal et peuvent être induits dans l'AVT (57). Plusieurs études ont été effectuées chez des rats et démontrent que l'expression de ces récepteurs est stimulée par des drogues d'abus comme la méthamphétamine, la nicotine, l'héroïne et la cocaïne (80, 88-90) ou encore par des antipsychotiques (91). Cela n'est pas très surprenant puisque ce genre de drogue augmente la sécrétion de dopamine (92) qui elle, induit l'expression de Nor-1 et Nur77 dans certaines de ces structures (78-82). Une autre étude indique que des rats de Lewis, reconnus pour être plus enclins aux comportements de dépendance, ont des niveaux de Nor-1 et Nur77 plus bas que les rats de Fisher (non enclin à la dépendance) dans des structures impliquées dans le circuit de récompense et que cela corrèle avec le développement du comportement du coureur compulsif associé à une plus grande susceptibilité à la dépendance (80). Pour ce qui est de Nurr1, l'abus de drogues comme la cocaïne et l'héroïne semble faire diminuer son expression tandis que l'amphétamine semble l'augmenter dans les structures du circuit de motivation et de récompense (93-96). Bref,

l'altération de l'expression des NR4A par les drogues d'abus ainsi que leurs rôles dans la régulation de la dopamine suggère donc que ces récepteurs participent aux changements de l'expression génique se produisant dans les mécanismes de dépendance ainsi que dans certains comportements associés à celle-ci (80, 88-91, 93).

En lien avec leur régulation de la signalisation dopaminergique et du stress, il est attendu que les récepteurs NR4A peuvent jouer un rôle dans la dépression. Il y en effet une implication proposée de Nor-1 dans la pathologie de la dépression par une étude sur des rats Wistar-Kyoto (modèle dépressif) qui décrit un niveau d'expression plus élevé de Nor-1 au niveau de l'amygdale (structure du cerveau fortement reliée à la dépression) comparée à des rats contrôles (Sprague-Dawley) et une baisse des comportements dépressifs a également été démontré avec un shRNA ciblant Nor-1 (97). Pour ce qui est de Nurr1, son expression est augmentée au niveau des structures cérébrales (hypothalamus, AVT, SN) chez des souris soumises au test de nage forcée, un modèle utilisé pour simuler la dépression et les auteurs suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme pour balancer la dopamine en situation de dépression (98). De plus une mutation diminuant l'activité transcriptionnelle de Nurr1 a été retrouvée dans un cas de patient maniaco-dépressif (99). En résumé, Nor-1 semblerait plutôt pro-dépression, alors que Nurr1 serait anti-dépression, ce qui montre encore une fois des actions différentes de ces récepteurs dans le système nerveux.

### **1.2.3.3 Nor-1, l'intégrité neuronale et les maladies neurodégénératives**

Le rôle de Nor-1 et des deux autres membres de sa famille est assez bien reconnu pour les aspects de neuroprotection et maladies neurodégénératives. Une étude montre l'augmentation de l'expression de Nor-1 au niveau du cortex de rat après l'induction d'une ischémie suivie d'un traitement avec l'érythropoïétine, une cytokine neuroprotectrice, suggérant ainsi un rôle de Nor-1 dans le processus de neuroprotection (100). Tous les membres de la famille de Nor-1 ont été associés à un effet de neuroprotection dans des études d'expression et de survie de cellules neuronales différenciées à partir de cellules souches de souris et traitées avec différents stimuli neurotoxiques comme le peroxyde ( $H_2O_2$ ) et l'inomicyne (101). Une étude récente utilisant des rats contrôles ou des rats ayant subi un écrasement du nerf sciatique en périphérie démontrent une augmentation de l'expression de Nur77 dans les nerfs ayant subi

la blessure et un rôle important de Nur77 dans la régénération nerveuse et la formation de la gaine de myéline (cellules de Schwann) par approche de shRNA (102). Au niveau des maladies neurodégénératives, la famille des récepteurs NR4A a été impliquée dans la maladie de Parkinson et l'Alzheimer, en lien avec l'implication des NR4A, en particulier Nurr1, dans la formation et le maintien du système dopaminergique (section 1.2.3.2) (66). En particulier, une étude a rapporté deux mutations de Nurr1 chez des patients atteints de Parkinson familial (64, 103, 104). Ces mutations réduiraient la transcription du gène de la tyrosine hydroxylase (gène cible de Nurr1) impliquée dans la synthèse de la dopamine (104). De plus, un mécanisme où Nurr1 inhiberait l'expression de gènes pro-inflammatoires neurotoxiques au niveau des microglies et astrocytes a été proposé, ce qui aurait pour effet de protéger les neurones avoisinants (64, 105). Malgré les évidences mentionnées plus haut suggérant des rôles neuroprotecteurs de Nor-1 et les membres de sa famille, il y a tout de même quelques études leur attribuant un rôle dans la neurodégénérescence. En effet, une étude récente décrit, par immunohistochimie de structures cérébrales de participants contrôles et atteints de la maladie de Parkinson ou d'autres maladies neurodégénératives, une présence accrue de Nor-1 et ce surtout dans les corps de Lewy qui sont des agrégations de protéine ayant un effet neurotoxique impliqué dans le Parkinson (106, 107). De plus, dans cette même étude, Nor-1 colocalisait avec l' $\alpha$ -synucléine phosphorylée, une protéine connue comme étant une composante importante des corps de Lewy (106, 108, 109). Ces résultats suggèrent donc une implication de l'accumulation de Nor-1 dans la maladie de Parkinson et les maladies impliquant l' $\alpha$ -synucléine (106). Une autre étude sur les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie après une ischémie décrit Nor-1 comme un gène médiateur de la neuro-inflammation (110). Il faut par contre mentionner que les évidences où Nor-1 est déclaré comme associé à la neuroinflammation (110) semblent plutôt indirectes. En effet, les auteurs observent par leurs résultats que l'expression de Nor-1 est augmentée seulement après le retour à la température normale suite à l'hypothermie induite, ce qui semble associer Nor-1 de façon indirecte à la neuroinflammation (110). De plus, aucune autre étude ne semble attribuer un rôle neuroinflammatoire de Nor-1. Il y a également un article qui a démontré que TR-3 (forme humaine de Nur77) est surexprimé au niveau des structures cérébrales reliées à la maladie d'Alzheimer chez les patients atteints en comparaison avec les participants contrôle ou affectés par d'autres maladies non neurodégénératives, identifiant ainsi la voie impliquant TR-3 et la caspase 8 dans la mort cellulaire neuronale et dans l'étiologie de

la maladie (111). En somme, dépendant du contexte, Nor-1 semble bénéfique pour la protection des neurones, ou peut agir comme un facteur pouvant mener à la neurodégénération. Le rôle exact de Nor-1 semble être encore à clarifier dans ces aspects. Fait intéressant, ce paradoxe dans les effets associés à Nor-1 semble également se produire au niveau des systèmes vasculaire et immunitaire. En effet, il est rapporté que les récepteurs NR4A peuvent être soit pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires et soit pro-apoptose ou anti-apoptose dépendamment du tissu et des conditions (112-114). Vu les différents rôles proposés dans les maladies neurodégénératives pour les récepteurs NR4A, il devient donc important de déterminer si Nor-1 joue aussi un rôle dans ces maladies et de clarifier ses effets neuroprotecteurs.

## **1.2.4 Rôles de Nor-1 dans les autres systèmes**

### **1.2.4.1 Nor-1, prolifération, apoptose et cancer**

Comme il a été mentionné un peu plus haut, Nor-1 semble avoir des effets bénéfiques pour la survie (69) et la prolifération cellulaire dans certaines lignées cellulaires comme les cellules musculaires lisse où il favorise l'expression de la cycline D1 (115). Cependant, Nor-1 est également impliqué dans le processus d'apoptose, comme c'est le cas au niveau de la sélection négative des lymphocytes T (114). Donc, il n'est pas surprenant de retrouver une relation entre Nor-1 et certains cancers. En effet, plusieurs études décrivent que des protéines de fusion résultant d'une translocation chromosomique entre Nor-1 et EWSR1 (EWS RNA binding protein 1) ou encore entre Nor-1 et TAFII68 (TATA-binding protein-associated factor II 68) serait des marqueurs et effecteurs importants impliqués dans le chondrosarcome myxoïde extrasquelettique (116, 117). De plus, une étude associe une expression plus élevée de Nor-1 avec un pronostic de neuroblastome, le cancer pédiatrique le plus courant (118). Par contre, Nor-1 peut également avoir des effets antitumoraux. Effectivement, des souris KO pour Nor-1 et *Nurr77* développent rapidement une leucémie myéloïde aiguë et l'expression de gènes antitumoraux apoptotiques tels que FAS-L et TRAIL est diminuée, les proposant ainsi comme gènes cibles (119).

#### 1.2.4.2 Nor-1 et le métabolisme

Nor-1 a été associé également comme régulateur du métabolisme glucolipidique. En effet, il semblerait que Nor-1 aide à la prolifération des cellules pancréatiques  $\beta$  en induisant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme le facteur de transcription E2F et la cycline E, suite à l'augmentation de son expression par le facteur Nkx6.1 en plus de favoriser le transport de glucose par l'insuline au niveau des adipocytes (46, 120). Mais, il semble y avoir une controverse concernant l'effet de Nor-1 sur l'expression de l'insuline elle-même. En effet, il est reporté que Nor-1 diminuerait l'expression et la sécrétion d'insuline de la lignée de cellules  $\beta$  de souris MIN6 en diminuant l'expression des gènes Pdx1 et NeuroD1 qui régulent positivement l'insuline alors qu'une autre étude rapporte une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'insuline par Nor-1 dans la lignée de cellules  $\beta$  de rats INS-1 (39, 121). Cette divergence semble être dépendante de l'utilisation de lignées cellulaires différentes provenant d'espèces différentes (121). Toujours en lien avec le métabolisme du glucose, un article décrit les NR4A comme régulateurs positifs de la synthèse de glucose hépatique par leur contrôle sur des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, comme l'enolase3 (ENO3), le transporteur de glucose 2 (SLC2A2) et la glucose-6-phosphatase (G6PC) (122). Cette étude démontre également une expression élevée des récepteurs NR4A dans des modèles de souris diabétiques avec une augmentation anormale de la production de glucose hépatique, suggérant ainsi une contribution de ces récepteurs dans la pathogenèse du diabète (122, 123). Nor-1 est également impliqué dans la thermogénèse au niveau des tissus adipeux où il régule l'expression de la protéine découplante UCP1 (124). Dans les muscles squelettiques, Nor-1 est impliqué dans le métabolisme oxydatif des acides gras et du glucose par son recrutement au niveau des promoteurs et son effet positif sur l'expression de gènes comme lipin-1 $\alpha$  et PDK4, modulant ainsi le métabolisme oxydatif (125). Dans ces mêmes muscles, Nor-1 augmenterait également la densité mitochondriale ainsi que les réserves en glycogène, ce qui pousserait les muscles squelettiques vers un phénotype favorisant la performance en exercice d'endurance (126, 127). Nor-1 joue également un rôle dans la régulation du poids corporel et de la prise de nourriture. Une étude récente montre que l'expression de Nor-1 est induite par la leptine au niveau de l'hypothalamus de souris, favorisant une interaction avec le récepteur des glucocorticoïdes pour provoquer des actions anorexiques (21). De plus, dans cette même étude,

les souris KO pour Nor-1 démontrent une prise de nourriture plus élevée que les souris contrôles (21). Un rôle de Nor-1 et des autres membres de la famille est proposé dans le métabolisme osseux avec l'augmentation de leur expression respective dans les ostéoblastes par l'hormone parathyroïdienne, et leur implication dans la croissance et la différenciation des ostéoblastes induite par le facteur de croissance des fibroblastes 8 (FGF-8) (128, 129).

#### **1.2.4.3 Nor-1 et le système cardiaque**

Un rôle de Nor-1 a été suggéré au niveau de la régulation de la pression artérielle puisqu'il a été démontré que l'expression de Nor-1 était induite par l'angiotensine II au niveau du cortex de la glande surrénale (40). De plus, Nor-1 régule l'expression de CYP21 et 3 $\beta$ -HSD codant pour des enzymes impliquées dans la production de l'aldostérone, un régulateur important de la pression artérielle (76). Au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux sanguins, Nor-1 semble être reconnu comme un gène impliqué dans leur survie, leur prolifération et la réorganisation des vaisseaux sanguins par sa régulation positive de gènes tels que ceux encodant la protéine inhibitrice d'apoptose 2 (cIAP2), la cycline D1 (CcnD1) et l'alpha-2-macroglobuline (A2M), une protéine réduisant l'activité des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 (113, 130, 131). Nor-1 et les autres membres de la famille sont également associés à l'athérosclérose, une maladie pro-inflammatoire chronique caractérisée par la formation dans les artères de plaques composées de cellules musculaires lisses vasculaires, de cellules spumeuses (macrophages remplis de gras), de cellules endothéliales vasculaires et d'autres types cellulaires (132). L'expression des NR4A est induite dans les macrophages, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires (133-136). De plus, dans les cellules endothéliales de souris, Nor-1 augmenterait l'expression des protéines d'adhésion intercellulaire VCAM-1 et ICAM-1, ce qui aurait pour effet d'augmenter l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, associant Nor-1 au développement de l'athérosclérose (133). Dans les macrophages de souris, Nur77 est décrit comme un facteur pro-inflammatoire, induisant l'expression de la kinase IKKi impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (137). Par contre, une étude dans les macrophages humains propose les NR4A comme des facteurs anti-inflammatoires, provoquant l'inhibition de la voie NF $\kappa$ B due au fait que le promoteur de la kinase IKKi humaine n'as possiblement pas d'élément de réponse au NR4A



contrairement au promoteur chez la souris (136). Par ailleurs, une étude portant sur les macrophages humains THP-1 a rapporté une baisse de certaines cytokines inflammatoires telle que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et des protéines inflammatoires des macrophages MIP1 $\alpha$  et 1 $\beta$ , ainsi qu'une baisse de l'accumulation de lipides dans les macrophages suite à la surexpression des trois NR4A (138). Aussi, une étude récente décrit Nor-1 en tant que facteur anti-inflammatoire dans les cellules musculaires lisses vasculaires par une inhibition indirecte de la protéine pro-inflammatoire NF $\kappa$ B (139). En somme, l'augmentation de l'expression des NR4A suite aux stimuli inflammatoires peut suggérer des effets pro-inflammatoires, mais un mécanisme de rétrocontrôle (*feedback*) où les NR4A pourraient réprimer l'inflammation une fois activée semble également proposé. Le rôle exact des récepteurs NR4A dans ces aspects apparaît donc encore incertain et reste à être caractérisé.

#### **1.2.4.4 Nor-1 et le système immunitaire**

Comme déjà mentionné, Nor-1 et Nur77 induisent des mécanismes apoptotiques pour contribuer à la sélection négative des lymphocytes T au niveau du thymus (114). L'expression de Nor-1 et Nur77 est accrue par des stimuli inflammatoires dans plusieurs types cellulaires, mais il est proposé qu'ils aient une action anti-inflammatoire chez les macrophages humains et le mécanisme proposé est celui d'une inhibition de la voie inflammatoire de NF $\kappa$ B (136). De plus, un rôle pour les NR4A est proposé dans l'activation (et l'apoptose pour Nurr1) des mastocytes suite à une exposition à des bactéries ou à des protéines membranaires de bactéries puisque l'expression des NR4A est augmentée par ce stimulus et il est intéressant de noter que, dans ce contexte, Nor-1 présentait une plus grande augmentation de son expression que les deux autres NR4A (140).

#### **1.2.4.5 Nor-1 et le système reproducteur**

Peu d'études décrivent un rôle de Nor-1 au niveau du système reproducteur. Par contre, Nor-1 a été associé à la mort cellulaire de cellules cancéreuses mammaires et ovariennes, suggérant un rôle de Nor-1 dans la tumorigenèse des tissus reproducteurs (141, 142). De plus, un rôle potentiel de Nor-1 dans le processus ovulatoire a été suggéré avec l'augmentation de son expression dans les cellules de la granulosa suite à une stimulation à la LH (143).

## 1.3 Le processus de SUMOylation

### 1.3.1 Introduction

Le potentiel transcriptionnel de la majorité des récepteurs nucléaires est dépendant de diverses modifications post-traductionnelles qui peuvent survenir en réponse au ligand ou autres signaux cellulaires. En particulier, l'une de ces modifications récemment décrites pour les récepteurs nucléaires est la SUMOylation. La SUMOylation fut découverte en 1996 et elle consiste en la conjugaison d'une petite protéine d'environ 11 kDa semblable à l'ubiquitine nommé SUMO (*small ubiquitin like modifier*) sur une protéine cible (144). Depuis, plusieurs cibles protéiques de SUMO ont été décrites, incluant plusieurs récepteurs nucléaires (7, 145).

### 1.3.2 Les motifs de SUMOylation

La SUMOylation se produit en général sur un site consensus  $\psi$ KXE, composé d'un acide aminé hydrophobe ( $\psi$ ) important pour le recrutement d'Ubc9 (une enzyme de conjugaison E2 impliquée dans le processus de SUMOylation), d'une lysine (K) qui fera une liaison covalente avec la protéine SUMO, d'un acide aminé quelconque (X) et d'un acide glutamique (E) qui possède une charge négative essentielle pour le recrutement d'Ubc9 (146). Il existe des variations du site accepteur de SUMO, soit le site consensus inversé (EXK $\psi$ ), le motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation d'un acide aminé à proximité de la chaîne (motif PDSM), et le motif dépendant d'une série d'acides aminés chargés négativement situés après le motif consensus (motif NDSM) (147-149).

<b>SUMO consensus</b>	$\psi$ K x E
<b>PDSM</b>	$\psi$ K x E x x S P
<b>NDSM</b>	$\psi$ K x E x x (E/D) <sub>4</sub>

**Figure 3 : Représentation de différents motifs de SUMOylation.**

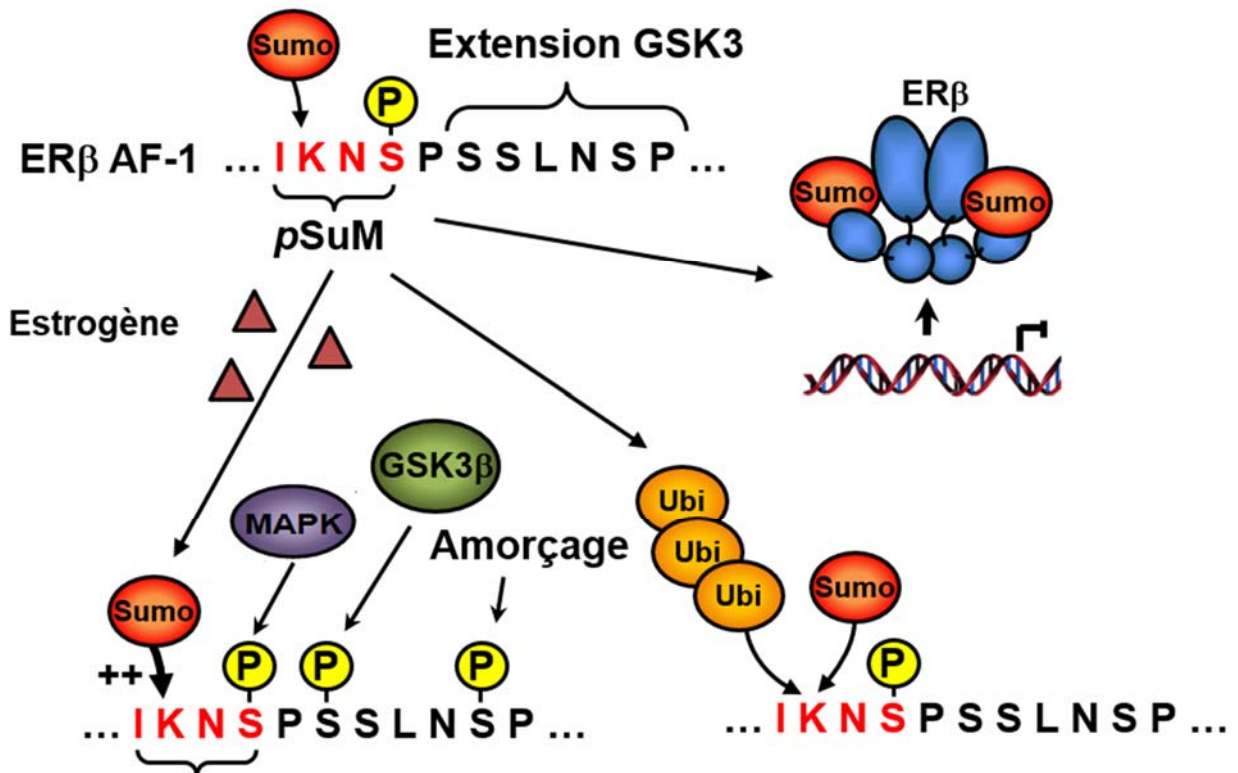
Le site SUMO consensus est constitué d'un acide aminé hydrophobe ( $\psi$ ), d'une lysine (K), d'un acide aminé quelconque (X) et d'un acide glutamique (E). Le motif de SUMOylation dépendant de la phosphorylation (PDSM) possède un site de phosphorylation composé d'une sérine (S) phosphorylable et d'une proline (P) à la suite du site consensus. Le motif de SUMOylation dépendant d'acide aminé chargé négativement (NDSM) possède quatre acides aminés chargés négativement étant soit des acides glutamiques (E) ou des acides aspartiques (D) après le site consensus. Figure tirée de Picard *et al.* (7)

Récemment, un nouveau motif non-consensus de SUMOylation a été découvert par notre laboratoire (7) et sera décrit en détail un peu plus loin (section 1.3.3). Il faut noter que la SUMOylation se produit sur des résidus lysines et que ces résidus sont aussi utilisés pour d'autres modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation et la neddylation (150). Cette dualité de modifications sur un même site apporte un niveau supplémentaire de régulation où la SUMOylation peut compétitionner avec d'autres modifications post-traductionnelles. C'est effectivement le cas pour le récepteur des estrogènes ER $\beta$  où la conjugaison de SUMO1 compétitionne avec l'ubiquitine sur la lysine 4 (7, 145). De plus, la SUMOylation peut également influencer une modification sur un autre site de la même protéine ou inversement, par exemple l'acétylation et la SUMOylation du récepteur nucléaire FXR qui sont deux processus mutuellement exclusifs et contrôlent des profils d'expression sélectifs (8). Il existe également des motifs de reconnaissance de SUMOylation (domaine SIM) permettant une interaction non covalente des protéines avec les SUMO et un tel motif est retrouvé dans la protéine de liaison de RAN RanBP2 permettant son interaction avec la protéine activatrice de la GTPase de RAN (RanGAP1) SUMOylée. (151). Ces séquences sont composées d'acides aminés hydrophobes flanqués par des résidus hydrophiles (ex. : sérines, acide glutamique et aspartique) qui permettent des interactions hydrophobes et hydrophiles avec les SUMO conférant ainsi une certaine spécificité (151, 152).

### 1.3.3 Le pSuM, un nouveau site de SUMOylation

Un nouveau site permettant la conjugaison de SUMO a récemment été identifié pour le récepteur des estrogènes ER $\beta$  (7). Ce site, appelé pSuM et représenté à la **figure 4**, est composé d'un acide aminé hydrophobe  $\psi$ , d'une lysine acceptrice (K), d'un acide aminé quelconque, mais suivi cette fois d'un résidu sérine qui, suite à une phosphorylation par les kinases de la famille MAPK/Erk, permet d'apporter la charge négative essentielle pour le recrutement d'Ubc9. De plus, le site pSuM de ER $\beta$  possède une extension permettant la phosphorylation par la kinase GSK-3 $\beta$ , pour optimiser la capacité de SUMOylation de ER $\beta$  en réponse à l'estrogène. Cette étude démontre également que cette SUMOylation entre en compétition avec l'ubiquitination ciblant la même lysine pour réguler la dégradation du récepteur ER $\beta$  et réduit également son activité transcriptionnelle en empêchant son interaction avec la chromatine (7).

De façon intéressante, une analyse d'homologie de séquence a permis d'identifier le site pSuM suivi de l'extension GSK-3 $\beta$  sur plusieurs autres facteurs de transcription, tels que GATA-4, NF-IL-3 et SREBP-2 (7), apportant un niveau de régulation beaucoup plus complexe de la SUMOylation sur plusieurs réseaux transcriptionnels. Parmi ces cibles potentielles de SUMOylation, on retrouve également le récepteur Nor-1 qui contient un motif pSuM étendu au niveau de l'AF-1 et dont la caractérisation de son rôle est un élément central de ce travail.

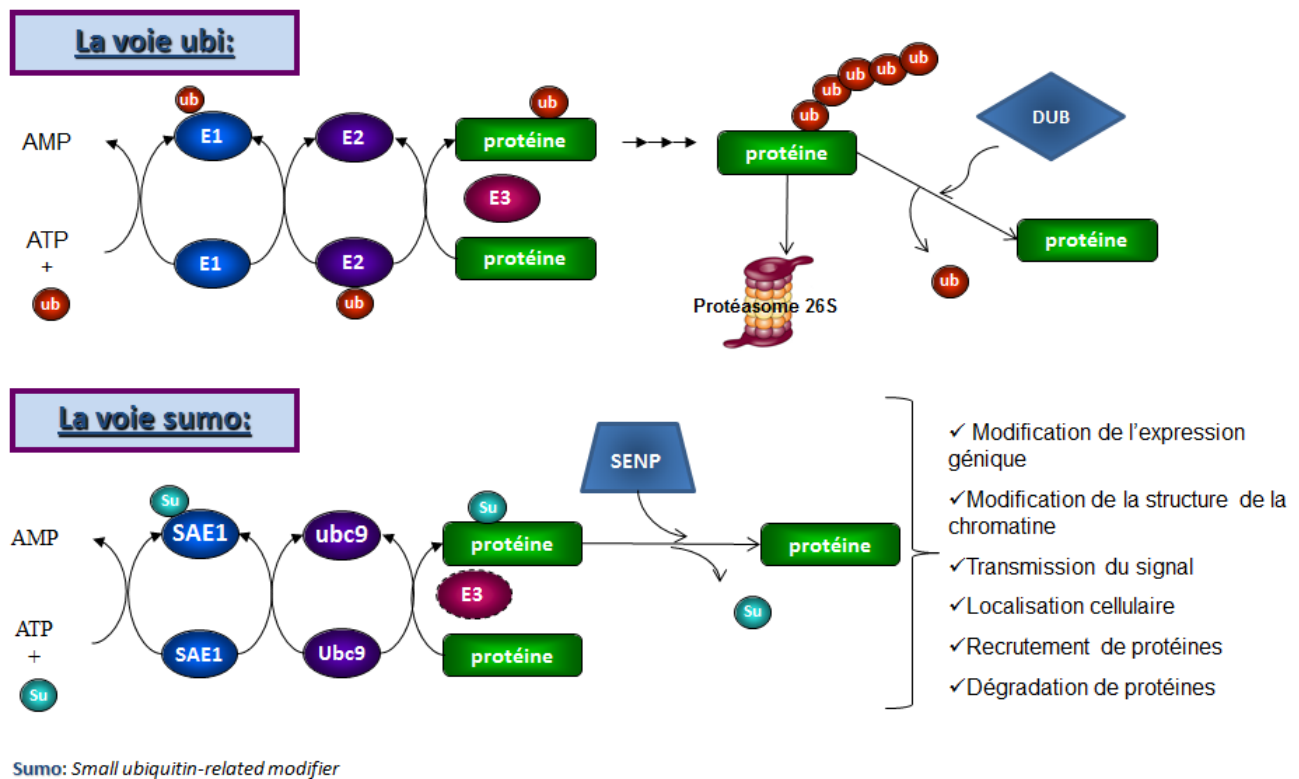


**Figure 4 : Modèle de SUMOylation du pSuM de ER $\beta$ .**

Mécanisme de SUMOylation du récepteur des estrogènes  $\beta$  (ER $\beta$ ) sur un motif de SUMOylation phosphorylé non-consensus (pSuM) composé d'une isoleucine (I), d'une lysine (K), d'une asparagine (N) et d'une sérine (S). À noter également l'extension du site pSuM ciblée par la kinase GSK-3 $\beta$  permettant de maximiser le potentiel de SUMOylation de ER $\beta$ . Figure tirée de Picard *et al.* (7).

### 1.3.4 Mécanisme de la SUMOylation

Jusqu'à maintenant, quatre protéines SUMO ont été identifiées, soit SUMO-1, -2, -3 et -4 (153). SUMO-1 a une séquence d'acides aminés moins conservée par rapport aux autres isoformes, ce qui résulte en des différences au niveau de ces cibles et sur sa capacité de former des chaînes (154). Les isoformes 2 et 3 sont très similaires au niveau de leur séquence, leur expression et leur activité (153). De plus, SUMO-2 et 3 présentent un site de SUMOylation consensus sur leur lysine 11 qui est absente de SUMO-1, leur permettant de former des chaînes de SUMO (155). Il faut par contre noter que des chaînes de SUMO-1 ont été décrites *in vivo* par spectrométrie de masse et que ces chaînes n'utilisaient pas de lysines appartenant à un site consensus de SUMO (156). L'isoforme 4 quant à elle, a récemment été découverte, et son rôle reste incertain (157). Les protéines SUMO sont transférées sur les protéines cibles par un mécanisme très similaire à celui de l'ubiquitination (**Figure 5**). En effet, la forme pro-SUMO subit d'abord une maturation par une protéase SENP (protéase SUMO spécifique) pour ensuite s'associer à une enzyme E1 composée de deux sous-unités, soit SAE-1 et 2 (enzyme activatrice de SUMO) dans une réaction demandant de l'ATP, pour ainsi activer SUMO. Par la suite, la protéine activée de SUMO est transférée sur une enzyme de conjugaison E2, soit Ubc9 (enzyme 9 de conjugaison de l'ubiquitine) qui transfère la protéine de SUMO sur la lysine acceptrice de la protéine cible avec ou sans l'aide d'une ligase E3 (ex : PIAS1), catalysant le transfert. La protéine cible peut également être désSUMOylée (réaction réversible) par une protéase SENP, ce qui fait que la SUMOylation est un processus très dynamique (145).



**Figure 5 : Mécanisme de la SUMOylation et de l'ubiquitination**

Représentation schématique du processus de SUMOylation en comparaison avec celui de l'ubiquitination. AMP : adénosine monophosphate; ATP : adénosine triphosphate; ub : ubiquitin; Su : SUMO; SAE1 : enzyme activatrice de 1; Ubc9 (enzyme conjuguant l'ubiquitin 9) ; E1 : Enzyme activatrice; E2 : Enzyme conjugante; E3 : Ligase; SENP : protéase SUMO spécifique; DUB : DéUbiquitinase. Figure adaptée de (Hickey et al, Nat Rev 2012 (158)) et (Flotho et al. Ann Rev Biochem 2013 (153)).

### 1.3.5 Effets de la SUMOylation

Selon la protéine sur laquelle elle s'attache, la SUMOylation peut avoir plusieurs effets différents. En effet, la SUMOylation peut agir en bloquant l'interaction de la protéine cible avec d'autres protéines par exemple des cofacteurs ou encore avec leurs substrats, inactiver certaines enzymes et empêcher l'interaction avec la chromatine comme c'est le cas avec le facteur de transcription p53 dont la SUMOylation bloque sa liaison à l'ADN et donc inhibe son activité transcriptionnelle (159, 160). L'ajout d'une protéine de SUMO peut également représenter un nouveau site d'interaction pour d'autres protéines, au moyen du domaine SIM par exemple comme c'est le cas avec RanBP2 et RanGAP1 SUMOylés, permettant ainsi le recrutement de cofacteurs ou encore de protéines qui induiront une relocalisation cellulaire, une dégradation de

la protéine cible ou encore un remodelage de la chromatine (144, 161, 162). Par exemple, la SUMOylation du facteur de transcription ELK-1 mène au recrutement de l'histone désacétylase 2 (HDAC-2) au niveau du promoteur des gènes cibles de ELK-1 menant à un remodelage de la chromatine résultant en une répression transcriptionnelle (162). La SUMOylation peut également mener à un changement de conformation d'une protéine qui pourrait lui donner ou lui enlever la capacité de lier une autre protéine ou un ligand par exemple ainsi qu'interférer avec d'autres modifications post-traductionnelles comme décrit un peu plus haut avec ER $\beta$  où la SUMOylation compétitionne avec l'ubiquitination (7, 145, 163). Un exemple de changement de conformation apporté par la SUMOylation est l'enzyme ADN glycosylase TGD qui retire les bases d'ADN thymine lorsqu'elles sont faussement pairées, autrement dit, non pairées avec une adénine (164). En effet, la SUMOylation de TGD change sa conformation et réduit son affinité pour le site abasique qu'elle crée en retirant la thymine et lui permet de se détacher et de recommencer son cycle (165, 166). Une des particularités soulevées pour plusieurs cibles de SUMOylation est que la proportion en protéines SUMOylées est en général assez faible par rapport à la même protéine non SUMOylée, faisant de la SUMOylation un processus finement régulé qui ne touche pas l'ensemble du pool disponible pour un substrat donné, mais plutôt une faible proportion de celui-ci. Néanmoins, les effets de la SUMOylation sur les protéines sont tout de même importants, affectant à divers degrés la fonction des protéines ciblées (167). Les raisons exactes de cette proportion ne sont pas connues, mais une des explications avancées viendrait du fait que la SUMOylation est un processus réversible et très dynamique, dont les effets persisteraient même après le processus de désSUMOylation (145). Par exemple, la SUMOylation du facteur de transcription LEF-1 augmente son interaction avec PIASy et diminue son activité transcriptionnelle en relocalisant LEF-1 dans des corps nucléaires non associés à la transcription, qui continuent de séquestrer LEF-1 même après sa désSUMOylation (145, 168). Bref, le processus de SUMOylation peut favoriser et de façon variable plusieurs effets de régulation selon la cible.

### 1.3.6 La SUMOylation et les maladies neurodégénératives

Comme mentionné plus haut, la SUMOylation cible plusieurs protéines lui conférant des rôles dans plusieurs systèmes. En lien avec les effets du récepteur Nor-1 au niveau du système nerveux et dans le processus de neuroprotection, il est intéressant de constater un lien entre la SUMOylation et les maladies neurodégénératives. En effet, des études de déplétion des protéines SUMO, faite par siRNA ou micro-ARN ciblant SUMO-1 ou 2 et 3, ont démontré une augmentation de la mort cellulaire de neurones primaires du cortex de souris en réponse à une privation en oxygène et glucose, suggérant l'importance des isoformes SUMO dans l'intégrité neuronale (169, 170). De plus, en utilisant une lignée de souris surexprimant Ubc9, des niveaux de SUMOylation plus élevés et une résistance accrue aux dommages cérébraux causés par une ischémie ont été retrouvés comparativement aux souris contrôles (171). De même, la SUMOylation de Nurr1 semble requise pour supporter l'effet neuro-protecteur de Nurr1 qui consiste à inhiber l'activité de NF $\kappa$ B, un facteur de transcription pro-inflammatoire (105). La protéine précurseur de l'amyloïde APP qui est responsable de la production de l'amyloïde B, une cause probable de la maladie d'Alzheimer, est une cible de SUMO qui mène à une réduction de l'activité de APP, suggérant un rôle de protection de la SUMOylation contre l'Alzheimer (172). La SUMOylation a également été étudiée dans le cadre de la sclérose latérale amyotrophique (ALS) où il est proposé que la SUMOylation de la protéine SOD1, dont l'agrégation est impliquée dans l'ALS, contribue à l'agrégation de SOD1 et par le fait même à la pathologie (173). De plus, la SUMOylation cible d'autres protéines ayant un effet neuroprotecteur, comme le facteur hypoxique HIF1 $\alpha$  et le récepteur ER $\beta$  potentiellement impliqués dans l'ALS en régulant leurs activités respectives, suggérant qu'une déficience du processus de SUMOylation serait impliquée dans l'ALS (174). La SUMOylation semble également viser la protéine Huntington dont la mutation est responsable de la maladie du même nom et une baisse de la SUMOylation globale semble réduire la neurodégénération chez la drosophile, indiquant que la SUMOylation participerait à la pathologie (175). En somme, il semble exister un paradoxe dans l'implication de la SUMOylation au niveau de certains processus de neuroprotection ou de neurodégénérescence du système nerveux, probablement dépendant du contexte et des protéines cibles impliquées.



## 1.4 Hypothèses de recherche

Comme nous l'avons décrit dans les sections précédentes, les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription contrôlant plusieurs gènes cibles impliqués dans diverses fonctions physiologiques. Le récepteur Nor-1 est un récepteur nucléaire orphelin dérivé des neurones et possédant une activité constitutive impliquée dans plusieurs procédés comme la survie cellulaire et neuronale, la guidance axonale du développement de l'hippocampe, le métabolisme, la balance énergétique au niveau de l'hypothalamus et l'inflammation (22). Nous nous intéressons principalement aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation des récepteurs nucléaires. En particulier, un nouveau site atypique de reconnaissance pour la conjugaison de la protéine SUMO-1 a été identifiée et démontré comme dépendant de l'activité Erk kinase pour induire la SUMOylation du récepteur ER $\beta$  (7). Le rôle exact de ce processus reste encore inconnu. Ce site atypique est également présent sur Nor-1, suggérant un rôle potentiel de la SUMOylation sur la fonction de Nor-1 que nous tenterons de caractériser. Nos hypothèses de recherche sont, en premier lieu, que le récepteur Nor1 est une cible de SUMO par l'intermédiaire du processus atypique de SUMOylation par le pSuM étendu; et en deuxième lieu, que ce processus régule l'activité transcriptionnelle de Nor-1 ainsi que l'expression de ces gènes cibles.

## 1.5 Objectifs de recherche

Deux objectifs sont proposés: 1- Déterminer le potentiel de SUMOylation de Nor-1 sur le site pSuM en particulier et ce, dans les neurones. 2- Déterminer l'impact de cette SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle et l'expression des gènes cibles de Nor-1.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1 Clonage des vecteurs d'expression et mutagenèse

Les différents plasmides d'expression de Nor-1 ont été préparés à partir du plasmide pCMX-Nor-1 obtenu du laboratoire de J. Drouin (IRCM). La séquence codante complète de Nor-1 a été obtenue par réaction de PCR en utilisant l'enzyme *Phusion* (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions fournies par la compagnie. Pour cette réaction, les amorces Nor-1-Start et Nor-1-Stop ont été synthétisées en ajoutant les sites de restriction *BamHI* en 5' et *NheI* en 3' pour permettre le sous-clonage. Le produit de PCR a donc été digéré avec les enzymes de restriction *BamHI* et *NheI* (Fermentas) et inséré dans le plasmide pCMX-MYC contenant l'épitope Myc, pour produire le plasmide pCMX-MYC-Nor-1. Pour générer le plasmide d'expression de Nor-1 avec l'étiquette HA, pCMX-MYC-Nor-1 a été digéré avec les enzymes *KpnI* (situé en 5' de MYC) et *BamHI* (situé en 5' de Nor-1) pour remplacer le fragment de l'épitope MYC et insérer le fragment de l'épitope HA provenant du plasmide pCMX-HA digéré selon la même stratégie, pour produire le plasmide pCMX-HA-Nor-1. La même stratégie de sous-clonage a été utilisée pour générer les vecteurs d'expression pCMX-GAL-Nor-1, pCMX-YFP-Nor-1 et pCMX-FLAG-Nor-1 possédant les étiquettes GAL (domaine de liaison à l'ADN du facteur Gal4), YFP (Yellow fluorescent protein) et FLAG, respectivement.

Les différents variants ponctuels du site de SUMOylation atypique pSuM de Nor-1 ont été générés par mutagenèse dirigée par PCR et confirmés par séquençage automatique. La mutation K137R contenant le remplacement ponctuel de la lysine-137 du site pSuM de Nor-1 par le résidu arginine a été générée par mutagenèse à partir du plasmide pCMX-Nor-1 au moyen des amorces mNor-1-K137R-F et mNor-1-K137R-R (**Tableau 1**). La mutagenèse dirigée a été effectuée avec la polymérase PWO (Roche) selon les instructions fournies et les clones mutés ont été identifiés et confirmés par analyse de séquence.

La même approche a été utilisée pour obtenir les mutations du résidu Serine-139 par l'alanine (S139A) et par l'acide glutamique (S139E) au niveau du site pSuM, en utilisant les paires d'amorces mNor-1-S139A et mNor-1-S139E (**Tableau 1**), respectivement.

En utilisant l'approche de mutagenèse dirigée, nous avons donc pu générer les différents variants dans le contexte du plasmide de pCMX-Nor-1. Par la suite, les plasmides pCMX-HA-Nor-1-K137R, pCMX-HA-Nor-1-S139E et pCMX-HA-Nor-1-S139A ont été obtenus par sous-clonage à partir des étiquettes HA.

Les plasmides codants pour FLAG-SENp-1, MYC-Ubc9 et GFP-SUMO-1 ont été décrits précédemment (7).

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées lors des réactions d'amplification par PCR pour la mutagenèse dirigée

Nom de l'amorce	Séquence
mNor-1-K137R	F : 5' G T A C T T C C G G C A G T C T C C G C C G T C G A C A C C G A C C A C 3' R : 5' G T G G T C G G T G T C G A C G G C G G A G A C T G C C G G A A G T A C 3'
mNor-1-S139A	F : 5' C A T G T A C T T C A A G C A G G C G C C G C C G T C G A C A C C G A C C A C 3' R : 5' G T G G T C G G T G T C G A C G G C G G C G C C T G C T T G A A G T A C A T G 5'
mNor-1-S139E	F : 5' C A T G T A C T T T A A G C A G G A G C C G C C G T C G A C A C C G A C C A C 3' R : 5' G T G G T C G G T G T C G A C G G C G G C T C C T G C T T T A A A G T A C A T G 3'

## 2.2 Culture cellulaire

Les cellules embryonnaires de reins humains HEK293T sont cultivées dans des pétris de 100 mm en présence de milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenant le rouge de phénol et supplémenté avec 5% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules croissent dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La transfection des cellules pour les différentes manipulations se fait à une confluence d'environ 70-80%.

Les cellules neuronales hippocampique de souris HT22 sont cultivées dans des pétris de 100 mm en présence de DMEM avec rouge de phénol et supplémenté avec 10% de FBS et 1%

de pénicilline-streptomycine. Les cellules croissent dans un incubateur à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La transfection des cellules pour les différentes manipulations se fait à une confluence d'environ 60-70%.

## **2.3 Immunoprécipitation et analyse Western blot**

Pour les expériences d'immunoprécipitation et de western blot avec extraits cellulaires totaux, les cellules HEK293T sont transfectées au moyen de la méthode de précipitation au phosphate de calcium et les cellules HT22 par la méthode de polyéthylimine (PEI) avec un ratio de 12 µl de PEI pour chaque µg d'ADN introduit dans le mélange de transfection. Les plasmides d'expression sont généralement introduits dans les mélanges de transfection à raison de 1 à 5 µg par puits, et ce, pour les deux types cellulaires. Les cellules sont transfectées pendant 16 heures et le milieu de culture est changé pour du milieu frais supplémenté avec sérum pendant environ 8 heures. Ensuite, ce milieu est lui-même remplacé par du milieu sans sérum pendant 16-20 heures. Lors des essais où l'on cherche à observer la SUMOylation de protéines d'intérêts, les cellules sont récoltées à 4°C dans du PBS contenant 20 mM de N-éthylmaleimide (NEM) et 2 mM d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) après un lavage rapide avec celui-ci. Elles sont ensuite lysées dans un tampon 50 mM Tris pH 7,5 contenant 1% de Triton X-100, 100 mM NaCl, 0,8% SDS, 20 mM NEM, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 mM NaF, 2 mM EDTA ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche).

Les échantillons sont ensuite incubés pendant 16 heures à 4°C avec un anticorps anti-HA (Roche) ou anti-FLAG (Cell signaling) selon le cas. Des billes de protéine A/G couplées à l'agarose (Santa Cruz Biotechnology) sont ajoutées aux échantillons pendant 2 à 4 heures et les protéines liées aux anticorps sont ensuite immunoprécipitées et lavées avec le tampon de lyse et séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Pour les expériences de western blot avec des extraits cellulaires complets, les échantillons sont directement migrés par électrophorèse SDS-PAGE après la lyse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et cette membrane est bloquée pendant une heure dans une solution contenant un réactif bloquant (Roche). Les membranes sont incubées pendant 16 heures en présence d'un anticorps anti-HA (Roche; hybridome 12CA5), anti-GFP (Roche), anti-FLAG (Sigma), anti-ERK1/2 (Biosource),

anti-ERK1/2 phosphorylé (Biosource) ou anti- $\beta$ -actine (Novus) selon le cas. Les membranes sont ensuite incubées à température pièce pendant un minimum de deux heures avec un anticorps secondaire approprié ciblant les anticorps primaires utilisés. Les signaux sont générés par luminescence (GE Healthcare) et analysés par imagerie (LAS4000; GE Healthcare).

## 2.4 Essai Luciférase

Pour les essais de gène rapporteur à la luciférase, nous avons utilisé le plasmide (NurRE)<sub>3</sub>bluc (J. Drouin, IRCM) qui contient trois éléments de réponse aux récepteurs nucléaires de la famille NR4A agencés en tandem devant le gène de la luciférase. Les cellules HEK293T sont d'abord transférées dans des plaques 24 puits où elles atteindront une confluence d'environ 70% avant d'être transfectées selon la méthode indiquée pour les essais d'immunoprécipitation (section 2.3). En général, on utilise 500 ng de plasmide (NurRE)<sub>3</sub>bluc, 200 ng de pCMX- $\beta$ -gal, 100 ng de vecteur exprimant pCMX-Nor-1 de type sauvage ou les différents mutants et on complète pour avoir au final un total de 1,5  $\mu$ g pour chaque puits. Pour les expériences avec un gradient de concentrations de SUMO, les plasmides d'expression pCMX-SUMO-1 et pCMX-HA-SUMO-2 sont ajoutés selon les quantités indiquées. Après 16 heures de transfection, les cellules sont remises dans du milieu frais avec sérum et incubées par la suite pendant 16 heures jusqu'à l'analyse. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon de phosphate de potassium en présence de 1% de Triton X-100. L'activité luciférase est mesurée suite à l'ajout du substrat D-luciférine (Roche) par captation de la bioluminescence avec un lecteur Wallac 1420 Victor (Turku, Finlande). L'activité de la  $\beta$ -galactosidase est également mesurée par absorbance permettant de normaliser l'activité luciférase en fonction de l'efficacité de transfection. Les données sont calculées en valeur d'activité luciférase relative (RLU) et exprimées en fonction de la valeur des échantillons contrôles indiqués. Chacune des conditions est répétée en triplicata et représente la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

## 2.5 Analyse de PCR quantitative

Pour les essais de PCR en temps réel, les cellules HT22 sont transférées dans des plaques 6 puits où elles atteindront une confluence de 20-30% avant d'être transfectées par la méthode au PEI avec 1  $\mu$ g de plasmide pCMX seul (contrôle) ou de plasmides codant pour pCMX-Ha-

Nor-1 de type sauvage ou muté (S139A, K137R, S139E). Pour la préparation de RNA, les cellules sont récoltées et lysée en présence de TRIzol (Ambion) et l'ARN est isolé par extraction avec acide guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme tel que décrit précédemment (176). Les échantillons d'ARN sont traités à la DNase (Ambion) pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, 1,1 µg d'ARN est utilisé pour chaque échantillon dans une réaction de transcription inverse afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) selon les instructions fournies. La réaction de PCR quantitative se fait à une concentration de 2 ng/µl d'ADNc en présence de Fast SyBr Green (Applied Biosystems) ainsi que des paires d'amorces appropriées avec l'aide de l'appareil QuantStudio6 Flex (Applied Biosystems). Dans ce cas-ci les amorces h/mEno3-F et h/mEno3-R (Tableau 2) pour l'énolase 3 ont été utilisées ainsi que les amorces 36B4-F et 36B4-R pour doser les niveaux de 36B4 (RPLP0) afin de normaliser les résultats pour chaque échantillon. Les données sont analysées avec le logiciel QuantStudio et exprimées en valeur relative par rapport au contrôle tel qu'indiqué sur les figures.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées lors des réactions de PCR quantitative

Nom du gène	Séquence de l'amorce
h/mEno3	F :5' TTCATCCAGAACTATCCCGTGG 3' R :5' AGCAATCCTCTTGGGGTTGG 3'
RPLP0	F : 5'AATCTCCAGGGGCACCATG 3' R : 5' ATG TTCAGCAGCGTGGCTTC 3'

## 2.6 Analyses statistiques

Les données des essais luciférase ont été analysées avec le test de *t*-student par rapport aux conditions contrôles. Les données sont exprimées en moyennes ± SEM où les différences par rapport aux contrôles sont considérées comme statistiquement significatives si  $p < 0.05$ .

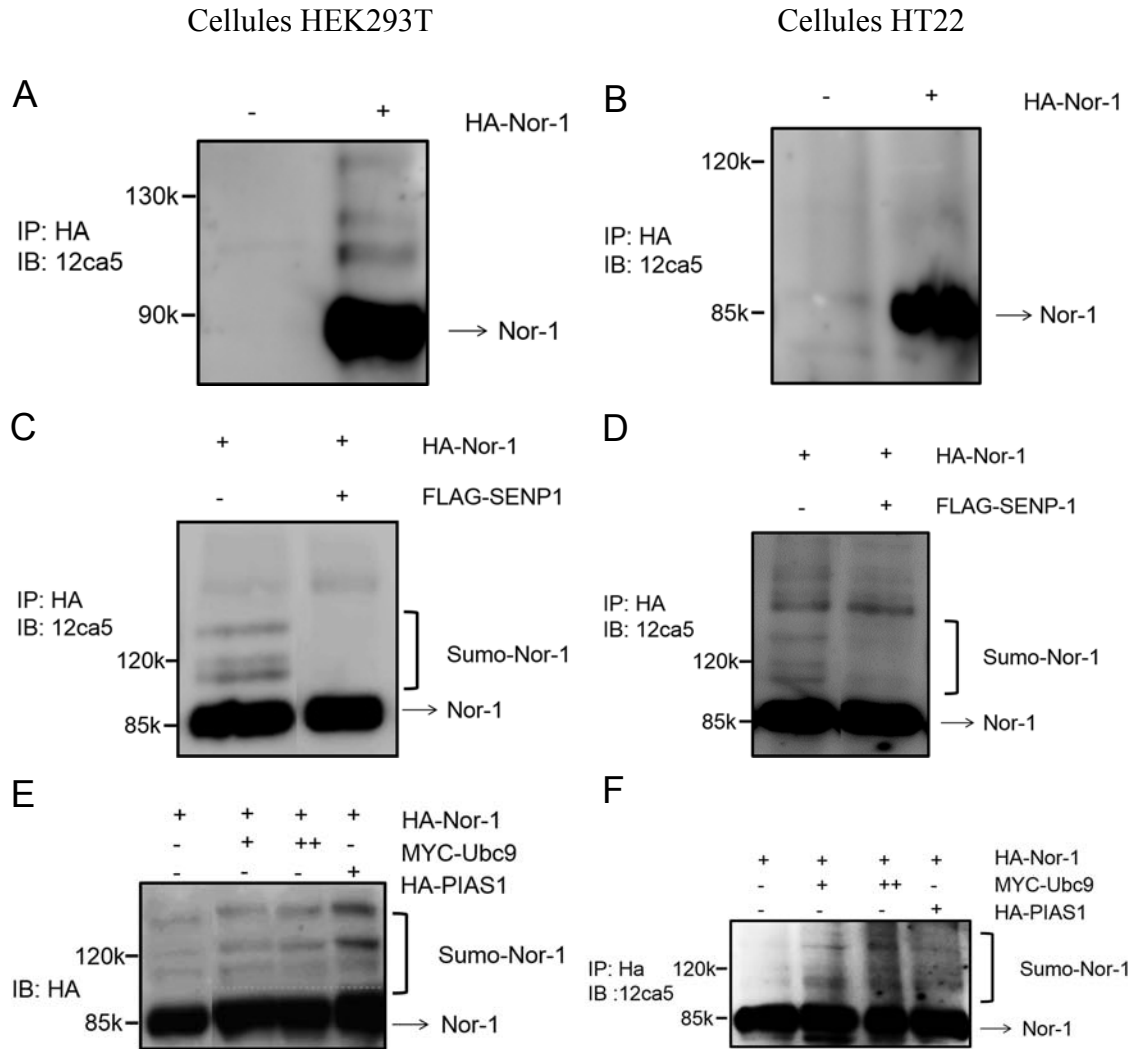
## 3. Résultats

### 3.1 Nor-1 est une cible de la SUMOylation.

Comme mentionné ci-dessus (section 1.3), la SUMOylation est un processus ciblant plusieurs protéines dont les récepteurs nucléaires. Dans cette étude, nous voulons déterminer si le récepteur Nor-1 est une cible de SUMOylation en lien avec l'identification d'un site pSuM consensus. Pour ce faire, il fallait tout d'abord optimiser et valider la technique d'immunoprécipitation. Nous avons donc généré un plasmide exprimant Nor-1 avec une étiquette HA en position N-terminale pour donner le plasmide pCMX-HA-Nor-1. Pour vérifier que ce plasmide exprime bien la protéine désirée et sa reconnaissance par un anticorps ciblant HA, les cellules humaines embryonnaires de reins HEK293T et les cellules neuronales de souris HT22 ont été transfectées soit avec pCMX vide (contrôle négatif) ou avec pCMX-HA-Nor-1 et nous avons procédé à un essai d'immunoprécipitation tel que décrit précédemment (section 2.3) avec un anticorps monoclonal ciblant HA et révélé par analyse de type western en utilisant un anticorps anti-HA (12CA5). Les résultats démontrent que l'approche de transfection transitoire permet l'expression de HA-Nor-1 dans les cellules HEK293T (**Figure 6A**) et HT22 (**Figure 6B**). En effet, le signal correspondant à HA-Nor-1 n'apparaît que dans les cellules où le plasmide pCMX-HA-Nor-1 est exprimé, alors qu'aucun signal n'est visible dans les cellules contrôles. De plus, la taille de la bande principale de HA-Nor-1 se situe environ à 85 kDa, alors que la taille prédite à partir du cDNA est de 70 kDa, sans doute expliquée par des modifications post-traductionnelles de Nor-1 dans les cellules non traitées. De façon intéressante, il est de plus possible d'observer trois bandes d'intensité variable directement au-dessus de Nor-1 dans les cellules HEK293T (**Figure 6A**) avec un patron similaire, mais moins intense dans les cellules HT22 (**Figure 6B**).

Pour établir la nature de ces trois bandes et valider s'il s'agit bien de signaux de SUMOylation, nous avons utilisé la même stratégie d'essai d'immunoprécipitation, mais en ajoutant le plasmide exprimant SENP-1, une protéase SUMO-spécifique efficace pour désSUMOyler les protéines cibles. Nous avons observé que les trois bandes présentes au-dessus du signal de Nor-1 disparaissent complètement lorsque pCMX-FLAG-SENP-1 est ajouté aux cellules HEK293T (**Figure 6C**). Le fait que ces trois bandes disparaissent lorsque FLAG-SENP-1 est ajouté suggère que ces bandes sont associées à un signal de SUMOylation endogène de Nor-1. Le même résultat a été conservé dans le contexte neuronal des cellules HT22 (**Figure 6D**). Pour valider davantage la nature de ces signaux, des essais d'immunoprécipitation ou d'extraits cellulaires complets suivi par analyse western blot ont été effectués de façon similaire, sauf que les plasmides codant pour la E2 SUMO conjugase Ubc9 et la E3 ligase PIAS1, deux composantes de la machinerie de la SUMOylation qui favorisent l'addition de SUMO (section 1.3.4), ont été ajoutés à la stratégie de transfection. Nous avons donc observé une augmentation de l'intensité des trois bandes dans les cellules HEK293T (**Figure 6E**) et HT22 (**Figure 6F**) en réponse à Ubc9 et PIAS1, suggérant que les trois signaux seraient effectivement associés à de la SUMOylation. Il est intéressant de noter que, du moins dans les cellules HEK293T, PIAS1 semble augmenter surtout l'intensité des deux bandes du haut (poids moléculaire plus élevé) suggérant une régulation différentielle de la SUMOylation au niveau des trois bandes. De plus, leur taille se situe à environ 100 kDa pour la première bande, ~114 kDa pour la deuxième et environ 135 kDa pour la troisième, ce qui suggère des modifications post-traductionnelles qui s'ajoutent entre 12 et 20 kDa, pouvant indiquer la présence de monoSUMOylation ou de polySUMOylation sur un ou plusieurs sites.





**Figure 6 : SUMOylation du récepteur Nor-1.**

(A) Les cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide d'expression pCMX-HA-Nor-1 ou pCMX vide (contrôle négatif), et les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-HA, suivi d'une analyse de type western en utilisant un anticorps ciblant HA (12CA5). (B) Les cellules HT22 ont été transfectées et analysées comme en (A). (C) Les cellules HEK293T ont subi les mêmes traitements qu'en (A) en présence ou absence de pCMX-FLAG-SENP-1. (D) Les cellules HT22 ont été transfectées et analysées comme en (C). (E) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression de HA-Nor-1 en présence ou absence de MYC-Ubc9 ou HA-PIAS1. Les extraits cellulaires complets ont été analysés par western blot avec un anticorps anti-HA. (F) Les cellules HT22 ont subi les mêmes traitements qu'en (A) en présence ou absence de MYC-Ubc9 ou HA-PIAS1.

### 3.2 L'activité transcriptionnelle de Nor-1 est régulée par la conjugaison de SUMO-1 et SUMO-2.

Après avoir démontré que Nor-1 pouvait être SUMOylé, nous avons voulu identifier quelle isoforme de SUMO, soit SUMO-1 ou SUMO-2, pouvait se conjuguer à Nor-1. Nous avons donc repris nos essais d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal anti-HA sur des cellules HEK293T transfectées avec le plasmide d'expression pCMX-HA-Nor-1 avec ou sans un plasmide exprimant GFP-SUMO-1. Nous avons ensuite analysé les membranes avec les anticorps ciblant HA pour observer Nor-1 et ciblant GFP pour observer SUMO-1. Les résultats démontrent que lorsque l'on ajoute GFP-SUMO-1, il y a un déplacement vers le haut du gel du profil de SUMOylation de Nor-1 normalement observé (**Figure 7A**). En effet, la première bande de SUMOylation (100 kDa) apparaît maintenant aux environs de 120-125 kDa, ce qui suggère qu'il s'agirait de HA-Nor-1 (85 kDa) combiné avec GFP-SUMO-1 (40 kDa), comparativement à une SUMOylation endogène (~11 kDa). Cette même bande de SUMOylation est également présente lorsque révélée avec l'anticorps anti-GFP (**Figure 7A**), confirmant ainsi que Nor-1 peut conjuguer SUMO-1. De plus, le fait que la première bande (100 kDa) semble déplacée suggère que l'expression ectopique de GFP-SUMO1 favorise la compétition avec la SUMOylation endogène sur le site représenté par le signal de 100 kDa (première des trois bandes de SUMOylation).

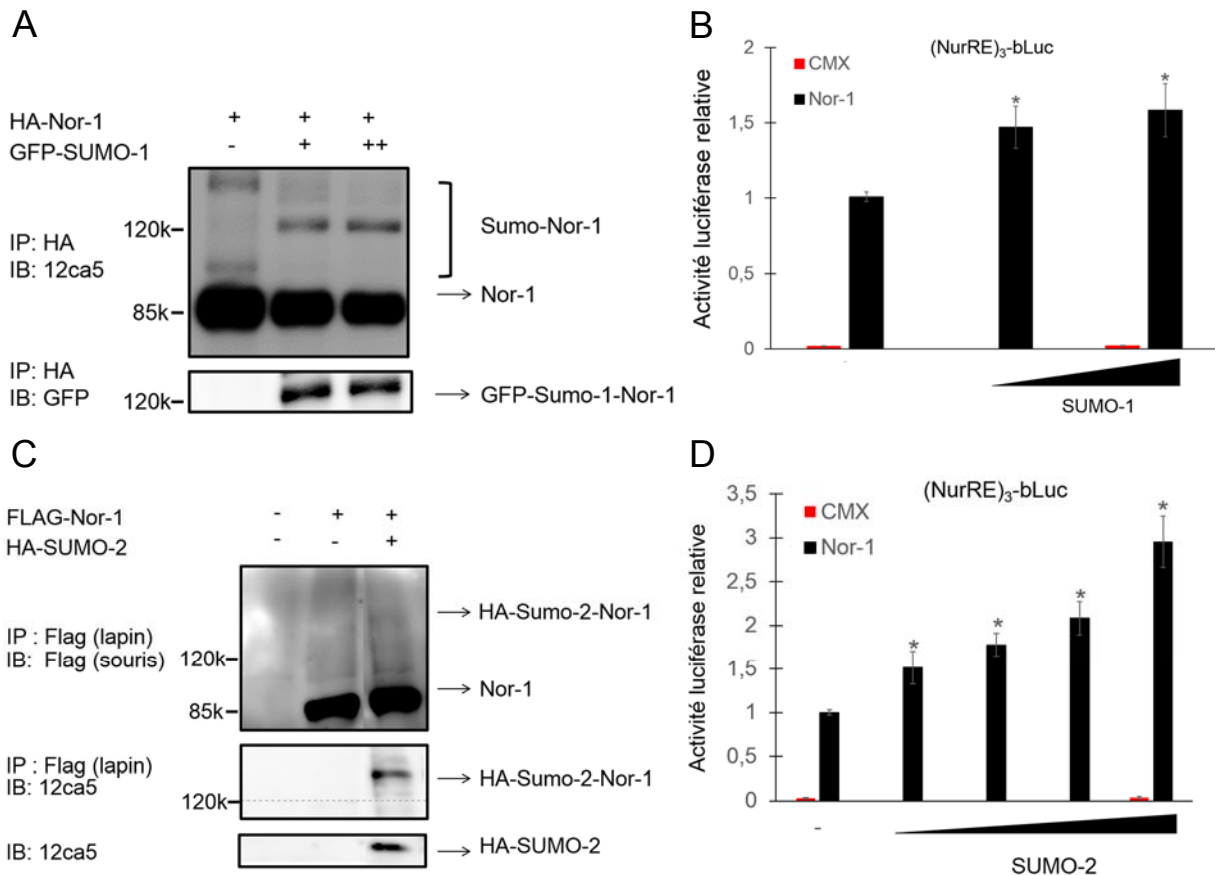
Nous avons par la suite déterminé le potentiel de SUMO1 à réguler l'activité transcriptionnelle de Nor-1. Nor-1 s'associe à un élément de réponse NurRE au niveau des régions promotrices des gènes pour réguler leur expression (26, 27). Nous avons donc mesuré l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par des essais de gène rapporteur à la luciférase sous le contrôle de trois éléments NurRE en tandem (plasmide (NurRE)<sub>3</sub>Luc). Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide pCMX-Nor-1 ou pCMX seul (contrôle négatif), en présence du plasmide (NurRE)<sub>3</sub>bluc et de quantités croissantes de pCMX-SUMO-1. Nous observons une forte augmentation (environ 50 fois) de l'activité luciférase en présence de Nor-1 comparativement au pCMX vide (contrôle), montrant ainsi une spécificité de l'activation de la transcription du gène de la luciférase en réponse à Nor-1 et validant ainsi l'utilisation du plasmide (NurRE)<sub>3</sub>bluc pour mesurer l'activité transcriptionnelle de Nor-1 (**Figure 7B**). De

plus, l'ajout de quantités croissantes de SUMO-1 contribue à augmenter de façon significative l'activité transcriptionnelle de Nor-1 de façon dose dépendante, suggérant que la SUMOylation favorise le potentiel transcriptionnel de Nor-1. Ces effets sont spécifiques à Nor-1 puisqu'il n'y a aucune augmentation d'activité lorsque SUMO-1 est ajouté en absence de Nor-1. Ces résultats démontrent que Nor-1 peut conjuguer SUMO-1, ce qui augmente son activité transcriptionnelle.

Pour tester le potentiel de conjugaison de Nor-1 à SUMO-2, nous avons utilisé sensiblement la même approche telle que décrite ci-dessus. En effet, les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide exprimant pCMX-FLAG-Nor-1 en absence ou présence du plasmide exprimant HA-SUMO-2 et nous avons effectué un essai d'immunoprécipitation avec un anticorps de lapin ciblant l'épitope FLAG et révélé les membranes avec un anticorps anti-FLAG de souris pour valider la présence de Nor-1 et un anticorps anti-HA pour déterminer les niveaux de SUMOylation. L'expression de FLAG-Nor-1 est démontrée à la **figure 7C** avec un signal qui apparait à environ 85 kDa, comparativement à aucun signal dans le contrôle négatif utilisant pCMX seul. De même, l'expression de HA-SUMO-2 est validée par analyse de type western sur des extraits cellulaires complets en utilisant un anticorps anti-HA. Les résultats de cette expérience indiquent que Nor-1 peut effectivement conjuguer SUMO-2 puisqu'un signal apparait au-dessus du signal de Nor-1 lorsque l'on ajoute HA-SUMO-2, comparativement au contrôle négatif sans HA-SUMO-2 (**Figure 7C**). Des bandes secondaires de SUMOylation de plus faibles poids moléculaires sont également observées en présence de HA-SUMO-2. Il est intéressant de noter que la taille de la bande principale est plus élevée que celle observée avec GFP-SUMO-1 (**Figure 7A**), malgré le fait que l'étiquette GFP rajoute 25 kDa alors que celle de HA n'ajoute qu'environ 1 kDa. On sait par contre que l'addition de SUMO-2 favorise la formation de chaînes, entraînant une polySUMOylation, contrairement à SUMO-1 qui s'ajoute en un seul monomère, ce qui pourrait expliquer également l'apparition de bandes de plus faible intensité dans le cas de SUMO-2 (**Figure 7C**) (153, 154).

De même que pour SUMO-1, nous avons déterminé le potentiel de SUMO-2 sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1 en utilisant des essais luciférase. Les cellules HEK293T ont donc été transfectées avec pCMX-Nor-1, ou pCMX vide (contrôle négatif) en présence du rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>bluc et de quantités croissantes d'HA-SUMO-2. Ces expériences nous indiquent que l'activité transcriptionnelle de Nor-1 est augmentée de façon dose dépendante et

significative avec l'ajout croissant de SUMO-2 (**Figure 7D**). Ces effets sont spécifiques à Nor-1 puisqu'il n'y a pas d'augmentation significative lorsque la dose maximale de SUMO-2 est ajoutée avec pCMX seul. Ces résultats indiquent le potentiel de Nor-1 à conjuguer SUMO-2, résultant en une augmentation de son activité transcriptionnelle.



**Figure 7 : Conjugaison et régulation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par SUMO-1 et SUMO-2.**

**(A)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression de HA-Nor-1 en présence ou absence de GFP-SUMO-1 et les extraits cellulaires immunoprécipités avec un anticorps anti-HA sont analysés par western blot avec un anticorps ciblant HA (12CA5) ou GFP. **(B)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides (NurRE)<sub>3</sub>bLuc, pCMX seul (contrôle négatif), pCMX-Nor-1 et des quantités croissantes de SUMO-1 (10 et 50 ng). Les résultats sont normalisés en fonction de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et indiquées en valeurs relatives par rapport à la condition contrôle établi à 1.0. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur sur la moyenne (SEM) d'au moins trois expériences en duplicata où  $p < 0.05$  est considéré

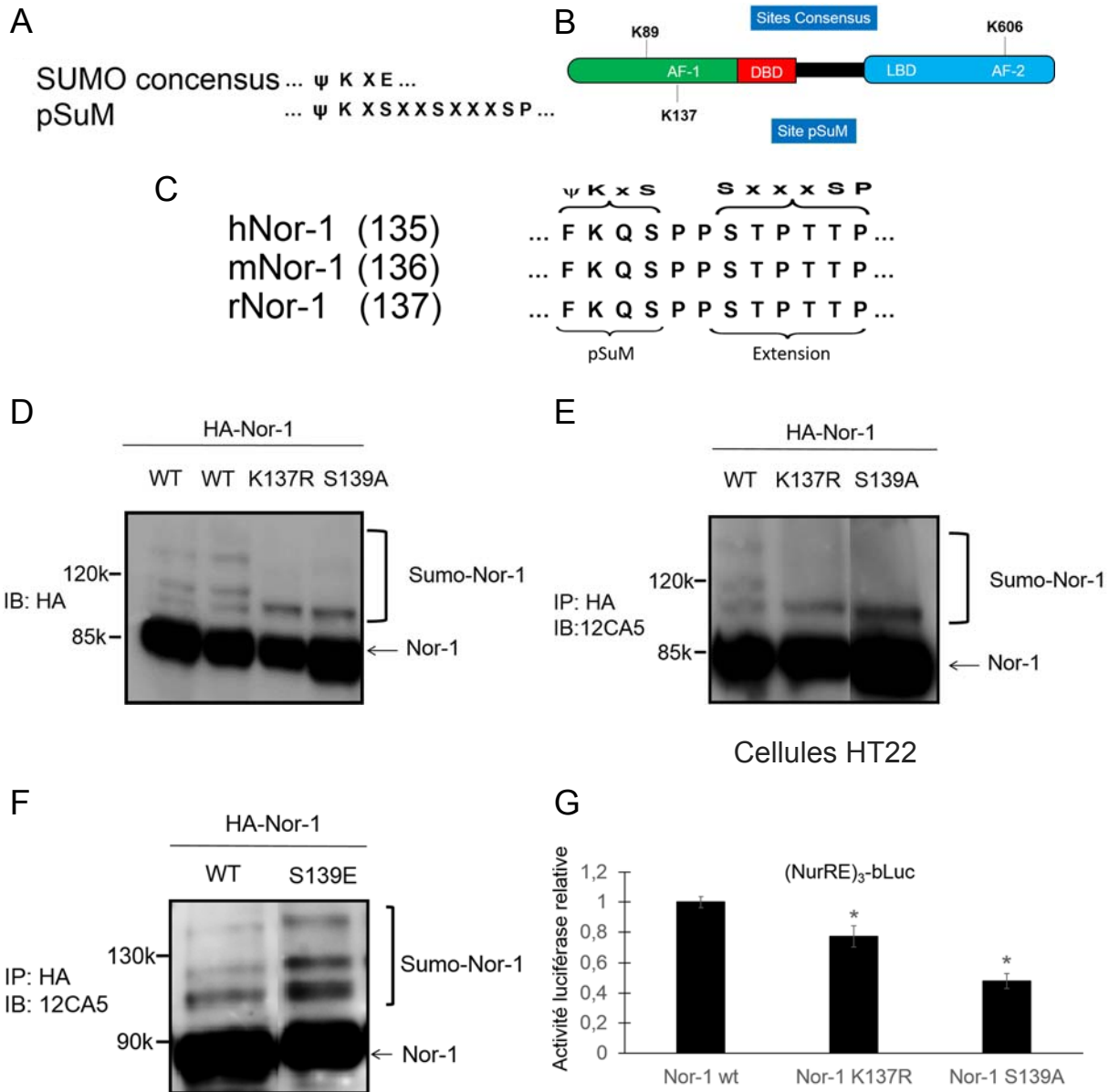
significatif (\*). **(C)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression de FLAG-Nor-1 en présence ou absence de HA-SUMO-2 et les extraits cellulaires immunoprécipités avec un anticorps anti-FLAG (lapin) sont analysés par western blot avec un anticorps ciblant FLAG ou HA. Les extraits cellulaires complets ont également été analysés par western blot avec un anticorps ciblant HA pour déterminer les niveaux d'expression d'HA-SUMO-2. **(D)** Les cellules HEK293T ont été traitées de la même manière qu'en (B), mais en présence de HA-SUMO-2 (10, 50, 100, 200 ng). Les données sont également représentées de la même façon qu'en (B).

### **3.3 Le site pSuM de Nor-1 est une cible de SUMOylation qui régule l'activité transcriptionnelle de Nor-1.**

Nous avons déterminé par homologie de séquence la présence d'un site atypique pSuM sur Nor-1 (**Figure 8A**). L'intérêt du projet est donc de caractériser son rôle dans la SUMOylation de Nor-1 et ses effets sur l'activité du récepteur. Comme il est indiqué à la **figure 8B**, il existe deux sites consensus de SUMOylation dans la séquence de Nor-1 (K89 et K606) ainsi qu'un site pSuM non-consensus (K137). Aucun de ces trois sites n'a été caractérisé pour Nor-1, mais pour les fins de ce mémoire, seul le rôle du site pSuM sera traité. Un alignement de séquence montre que le pSuM avec son extension est conservé au niveau des formes humaines, de souris et de rat de Nor-1, suggérant ainsi un rôle partagé chez les mammifères (**Figure 8C**). Il est à noter que la position de la lysine du pSuM est différente chez les trois espèces dû à l'ajout ou la délétion d'un acide aminé dans la portion N-terminale des récepteurs. Il est également à noter que ce site atypique n'est pas présent dans les séquences des autres récepteurs de la famille NR4A, soient Nur77 et Nurr1, suggérant un mécanisme de régulation unique à Nor-1 (séquences non montrées). Pour déterminer le rôle du site atypique pSuM, nous avons généré des mutants ponctuels au niveau de la lysine-137 acceptrice (K137R), ainsi qu'au niveau de la sérine-139 potentiellement utilisée pour fournir la charge négative par phosphorylation (mutation invalidante S139A et mutation phospho-mimétique S139E). Les constructions pCMX-HA-Nor-1-K137R, pCMX-HA-Nor-1-S139A et pCMX-HA-Nor-1-S139E ont donc été obtenues par mutagenèse dirigée par PCR et sous-clonage, et utilisées en transfection dans les cellules HEK293T et HT22. Nous avons donc effectué des essais d'immunoprécipitation avec l'anticorps monoclonal ciblant HA et des analyses de type western sur des extraits cellulaires

complets pour déterminer le potentiel de SUMOylation des formes mutées en comparaison à Nor-1 de type sauvage. Nous avons pu observer qu'en substituant la lysine-137 par un résidu arginine (K137R), abolissant ainsi la possibilité de conjugaison de SUMO, deux des trois bandes de SUMOylation sont perdues comparativement à Nor-1 intact, suggérant ainsi que le site pSuM est une cible de SUMOylation (**Figure 8D**). Il est intéressant de noter que les deux bandes perdues avec le mutant K137R sont les deux mêmes bandes augmentées en présence de PIAS1 (**Figure 6E**), suggérant une régulation similaire pour ces deux bandes. De plus, il est à noter que l'intensité de la première des trois bandes de SUMOylation (~100 kDa) est augmentée pour le mutant K137R comparativement à Nor-1 non muté, suggérant que ce signal de SUMOylation n'implique pas la lysine-137 du site pSuM, mais probablement un autre site sur Nor-1. Cette augmentation du signal suggère également la possibilité d'une régulation du processus de SUMOylation entre la lysine-137 et cet autre site potentiel. Nous avons également testé le potentiel de SUMOylation du mutant S139A où la phosphorylation de la sérine-139 du pSuM qui, selon le modèle d'ER $\beta$  (7), apporte la charge négative nécessaire au recrutement d'Ubc9 pour ainsi permettre la SUMOylation est abolie. La mutation S139A confère le même patron de SUMOylation que la mutation K137R, démontrant ainsi l'importance de cette sérine dans le processus de SUMOylation et le potentiel du pSuM de Nor-1 pour accepter la SUMOylation (**Figure 8E**). Les mêmes observations ont été obtenues par essais d'immunoprécipitation dans le contexte neuronal avec les cellules HT22 (**Figure 8F**), démontrant l'utilisation du pSuM dans différents contextes cellulaires. Nous avons également testé le potentiel de SUMOylation du mutant phospho-mimétique S139E où la sérine-139 du pSuM est changée en acide glutamique (E) procurant ainsi une charge négative constitutive pour favoriser le recrutement de la conjugase Ubc9 et donc une induction de la SUMOylation. On a observé une forte augmentation de l'intensité des trois bandes de SUMOylation pour le mutant S139E dans les cellules HEK-293T comparativement à Nor-1 non muté, renforçant l'utilisation du pSuM phosphorylé dans le processus de SUMOylation de Nor-1 (**Figure 8F**). Ces résultats nous indiquent donc que Nor-1 est SUMOylé sur son pSuM par un mécanisme nécessitant l'addition d'une charge négative.

Afin d'étudier l'effet de la SUMOylation du pSuM sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1, nous avons effectué des essais luciférase dans les cellules HEK293T transfectées avec le rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>bluc en présence de soit pCMX-Nor-1, pCMX-Nor-1-K137R ou pCMX-Nor-1-S139A. Les résultats présentés à la **figure 8G** montrent que la mutation K137R diminue de façon significative l'activité transcriptionnelle de Nor-1 de plus de 20%, tandis que la mutation S139A diminue l'activité de Nor-1 d'environ 50%, suggérant que la SUMOylation du pSuM est importante pour le maintien optimal de l'activité transcriptionnelle de Nor-1. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en surexprimant les isoformes de SUMO (**Figures 7B et 7D**). De plus, la mutation de la sérine-139 semble affecter davantage l'activité transcriptionnelle de Nor-1 comparativement à la lysine-137, suggérant un rôle élargi de régulation de la sérine-139 sur l'activité de Nor-1.



**Figure 8 : SUMOylation et régulation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par son pSuM.**

(A) Schéma montrant la séquence consensus d'un site du SUMOylation ainsi que la séquence du site de SUMOylation atypique pSuM. Figure tirée de Picard *et al.* 2012 (7) (B) Représentation schématique du récepteur nucléaire Nor-1 avec les sites de SUMOylation consensus et non-consensus indiqués. (C) Alignement des séquences du site de SUMOylation atypique pSuM sur le récepteur Nor-1 humain, de souris et de rat. Le numéro devant chacune des séquences indique le numéro du premier acide aminé présenté dans la séquence. (D) Essai western blot sur des extraits cellulaires totaux de cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression exprimant soit HA-Nor-1 sauvage, HA-Nor-1 K137R ou HA-Nor-1 S139A. Les extraits cellulaires complets sont analysés par western blot avec un anticorps ciblant HA. (E)

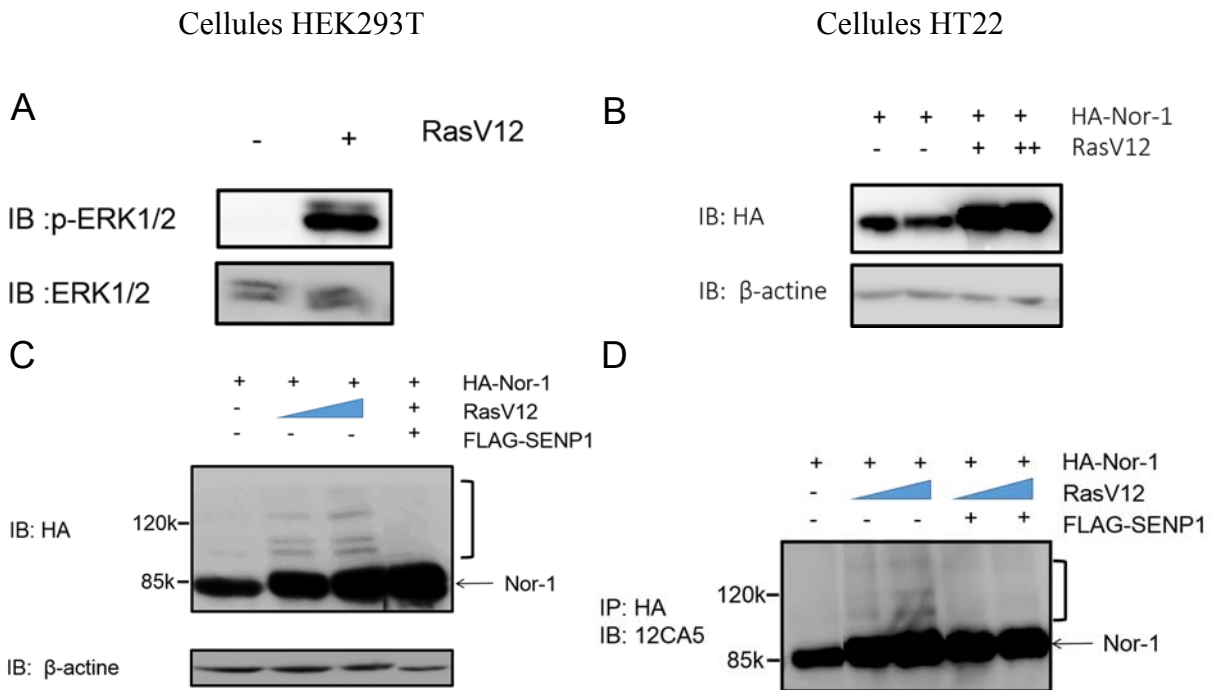


Les cellules HT22 ont été transfectées avec un plasmide d'expression exprimant soit HA-Nor-1 sauvage, HA-Nor-1 K137R ou HA-Nor-1 S139A de façon similaire à (D). Les extraits cellulaires immunoprécipités avec un anticorps anti-HA sont analysés par western blot avec un anticorps anti-HA. **(F)** Les cellules 293T ont été transfectées avec un plasmide d'expression exprimant soit HA-Nor-1 sauvage ou HA-Nor-1 S139E et analysées comme en (E) par la suite. **(G)** Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>bluc en présence du plasmide exprimant soit Nor-1 sauvage, Nor-1 K137R ou Nor-1 S139A. Les résultats sont normalisés en utilisant l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et représentés en valeur relative comparativement aux cellules transfectées avec pCMX-Nor-1 seulement. Les barres d'erreurs indiquent l'erreur de la moyenne (SEM) et les valeurs sont considérées significatives (\*) si  $p < 0.05$ .

### **3.4 La voie des MAPK augmente les niveaux protéiques de Nor-1 et son état global de SUMOylation.**

Comme cela a déjà été mentionné à la section 1.3.3, il est proposé que la voie des MAP kinases potentialise la SUMOylation d'ER $\beta$  en phosphorylant la sérine de son pSuM (7). Nous avons donc testé si le même mécanisme pouvait être utilisé pour la SUMOylation du pSuM de Nor-1. Pour activer les voies des MAP kinases, nous avons utilisé l'oncogène RasV12 qui maintient une activation constitutive des trois voies des MAP kinases, soient celles des Erk, Jun et p38. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide exprimant HA-Nor-1 en présence du plasmide d'expression de RasV12, et les extraits cellulaires complets ont été analysés par western avec un anticorps ciblant les formes phosphorylées de ERK1/2. Tel que démontré à la **Figure 9A**, l'expression de RasV12 contribue grandement à augmenter les niveaux de phosphorylation de ERK1/2, indiquant son efficacité à activer la voie des MAPK. Par la suite, les cellules HEK293T et HT22 ont été transfectées avec le plasmide exprimant HA-Nor-1 en présence ou en absence de RasV12 et/ou FLAG-SEN1 et avons effectué l'électrophorèse SDS-PAGE sur des extraits cellulaires complets ou immunoprécipités avec un anticorps anti-HA pour ensuite faire l'analyse de type western avec un autre anticorps anti-HA. Les résultats démontrent que lorsque l'on rajoute RasV12, l'expression protéique de Nor-1 est augmentée dans les deux types cellulaires (**Figures 9B et 9C**), suggérant un rôle des MAPK dans la stabilité de Nor-1. De plus, l'expression de RasV12 permet d'augmenter également les niveaux des trois bandes de SUMOylation de Nor-1 de manière dose-dépendante, suggérant ainsi une potentialisation de la SUMOylation de Nor-1 par la voie des MAPK dans les cellules HEK293T et HT22 (**Figure 9C et 9D**). Dans ces mêmes conditions, l'ajout de SEN1 permet

d'abolir la présence des trois bandes en présence de RasV12, démontrant encore une fois que ces signaux sont associés à de la SUMOylation (**Figure 9C**). Bref, nos résultats démontrent l'importance de la voie des MAPK pour favoriser l'état global de SUMOylation du récepteur Nor-1.

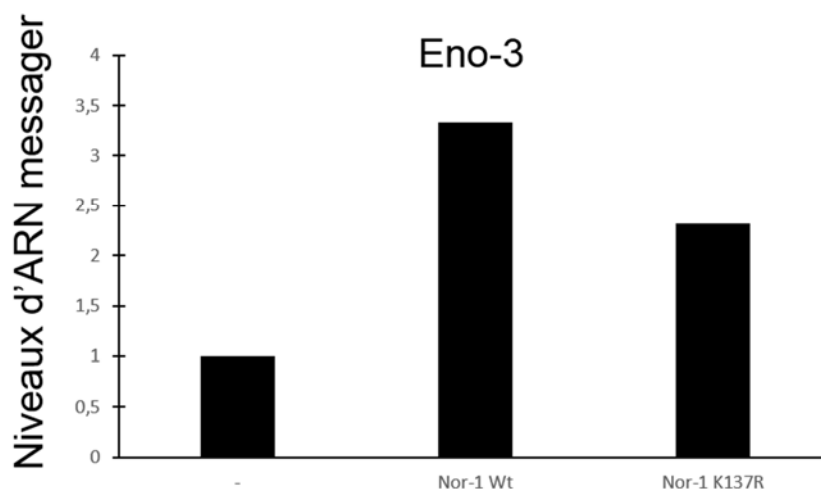


**Figure 9 : L'activation de la voie MAPK/Erk augmente l'état global de SUMOylation de Nor-1.**

(A) Les cellules HEK293T ont été transfectées en présence ou absence du plasmide d'expression de RasV12, et les extraits cellulaires complets ont été analysés par western blot avec un anticorps anti-ERK1/2 ou anti-ERK1/2 phosphorylé. (B) Les cellules HT22 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de HA-Nor-1 en présence ou absence de RasV12, et les extraits cellulaires complets ont été analysés par western blot avec un anticorps anti-HA ou anti-β-actine. (C) Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide d'expression de HA-Nor-1 en présence ou absence de RasV12 et/ou FLAG-SENP-1 et traitées comme en (B) pour la suite. (D) Les cellules HT22 ont été transfectées avec le plasmide d'expression de HA-Nor-1 en présence ou absence de RasV12 et/ou FLAG-SENP-1, et les extraits cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-HA et analysés par western blot avec un anticorps anti-HA.

### **3.5 La SUMOylation du pSuM de Nor-1 est importante pour l'expression de gènes cibles.**

Les récepteurs nucléaires agissent comme facteurs de transcription sur une multitude de gènes cibles et Nor-1 n'est pas une exception à cette règle. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment (section 1.2), plusieurs gènes cibles de Nor-1 sont connus. Un de ces gènes cibles est celui qui code pour l'enolase-3 (ENO3), une enzyme de la glycolyse qui catalyse la transformation du 2-phospho-D-glycerate en phosphoenolpyruvate. Il a été démontré que le promoteur de ENO3 contient un élément NBRE fonctionnel et répondant à Nor-1 (122). En lien avec l'importance du site pSuM à maintenir un niveau adéquat d'activité de Nor-1 (**Figure 8G**), nous avons testé si cette SUMOylation pourrait avoir des effets sur la capacité de Nor-1 à réguler l'expression de ces gènes cibles. Pour vérifier cela, nous avons transfecté les cellules HT22 avec un plasmide exprimant soit CMX seul (contrôle négatif), HA-Nor-1 sauvage ou HA-Nor-1 K137R et extrait l'ARN de ces cellules avec la méthode d'extraction avec acide guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme. Ensuite, nous avons synthétisé de l'ADNc par réaction de transcriptase inverse et finalement effectué une réaction de PCR quantitative pour déterminer les niveaux d'expression génique. Dans des essais préliminaires d'expression, nous avons observé une augmentation de 3,3 fois des niveaux d'expression d'ENO3 dans les cellules HT22 transfectées avec Nor-1 comparativement au contrôle négatif (**Figure 10**), démontrant qu'effectivement, ENO3 est régulé de façon positive par Nor-1. Dans les mêmes conditions, l'ajout du mutant K137R a provoqué une baisse de 30% de l'expression d'ENO3 comparativement au Nor-1 non-muté, suggérant qu'une altération au niveau du pSuM amène une réduction de l'expression de ce gène cible. Ces résultats suggèrent donc que ENO3 est effectivement un gène cible de Nor-1 dans le contexte neuronal des cellules HT22 et que la SUMOylation sur le site atypique de Nor-1 est importante pour l'induction de l'expression de ces gènes cibles. Ces données étant préliminaires, il reste donc à confirmer l'importance du pSuM de Nor-1 sur un profil plus large de gènes cibles.



**Figure 10 : La SUMOylation atypique de Nor-1 joue un rôle dans l'induction de ses gènes cibles.**

Les cellules HT22 ont été transfectées avec pCMX seul (contrôle négatif), pCMX-Nor-1 sauvage ou pCMXNor-1 K137R. L'ARN a été extrait, transformé en ADN complémentaire et analysé par PCR quantitative avec des amorces ciblant le gène de l'enolase-3 (ENO3). Les données ont été normalisées selon l'expression du gène RPLP0 et sont indiquées en valeurs relatives par rapport aux cellules transfectées avec pCMX seul établies à 1.0.

## 4. Discussion

Comme mentionné auparavant (section 1.3.3), notre laboratoire a récemment identifié un nouveau motif de SUMOylation dépendant de l'activité kinase des MAPK nommé pSuM sur ER $\beta$ . Ce motif de SUMOylation atypique se retrouve également dans la séquence de Nor-1(7). Nous voulions donc déterminer le potentiel de SUMOylation de Nor-1 sur le site pSuM ainsi de que démontrer les effets de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1. Jusqu'à présent, il n'y aucune indication dans la littérature que Nor-1 est SUMOylé. Ce projet avait donc pour but de caractériser/établir le rôle de modifications post-traductionnelles, en particulier la SUMOylation, sur la régulation de l'activité de Nor-1 et les processus biologiques sous le contrôle de Nor-1.

Premièrement, le potentiel de SUMOylation de Nor-1 a été étudié par des essais d'immunoprécipitation réalisés avec des cellules HEK293T et HT22 surexprimant Nor-1 avec un épitope HA ainsi que des anticorps anti-HA. La spécificité des anticorps pour HA (donc Nor-1), est démontrée dans les deux types cellulaires aux **figures 6A** et **6B** par l'absence de signaux dans les contrôles négatifs. Notre laboratoire se spécialise dans l'étude des récepteurs nucléaires et utilise des techniques spécifiques et optimisées, tel que décrit à la section 2.3 pour étudier la SUMOylation des protéines. Sur les **figures 6A, 6C, 6D, 6E, 6F**, il est possible de voir trois bandes caractérisées comme étant associées à de la SUMOylation de Nor-1, démontrant ainsi le potentiel de ces approches pour identifier les niveaux de SUMOylation, tel que décrit dans l'article de Picard *et al* (7). En effet, dans cet article, la capacité du récepteur ER $\beta$  à conjuguer SUMO-1 a été déterminée avec l'identification d'un site atypique de SUMOylation sous le contrôle des voies des kinases Erk et GSK-3 $\beta$ , permettant d'optimiser les niveaux de SUMOylation en réponse à l'estrogène.

Dans la présente étude, nous avons déterminé que Nor-1 est une cible de SUMOylation donnant un profil caractéristique de trois bandes spécifiques. Pour étudier plus en profondeur le patron des bandes observées et vérifier s'il s'agit bien de SUMOylation, SENP-1 a été ajouté dans les cellules pour les essais d'immunoprécipitation. SENP-1 est une protéase SUMO-spécifique pouvant désSUMOylé les protéines au niveau du noyau cellulaire (177). Alors, si les bandes migrant au-dessus de Nor-1 sont bel et bien reliées à la SUMOylation, on peut s'attendre à les voir disparaître, sinon fortement diminuer en intensité en présence de SENP1. Le profil des trois bandes a effectivement complètement disparu dans ces conditions dans les cellules 293T (**Figure 6C**) et HT22 (**Figure 6D**) transfectées avec SENP1. De plus, les enzymes conjugase E2 (Ubc9) et ligase E3 (PIAS1), impliquées dans le processus de SUMOylation et pouvant ainsi potentialiser la modification, ont été ajoutées dans les expériences d'immunoprécipitation et de western blot avec extraits cellulaires complets. Tel qu'observé aux **figures 6E** (cellules 293T) et **6F** (cellules HT22), on note une augmentation des niveaux des trois bandes situées au-dessus de Nor-1, renforçant ainsi l'hypothèse que ces bandes soient reliées à la SUMOylation.

De plus, on note à la **figure 6E** que l'intensité des deux bandes au-dessus de Nor-1 à 114 et 135 kDa, est plus élevée que la première bande (~100 kDa) en présence de PIAS1. Cela

pourrait suggérer que les niveaux des trois bandes ne sont pas régulés de la même manière. Par contre, dans les cellules HT22 (**Figure 6F**), PIAS1 augmente l'intensité des trois bandes au-dessus de Nor-1 de façon relativement égale. Cela pourrait indiquer une régulation de la SUMOylation de Nor-1 qui diffère selon les sites de conjugaison possibles et le contexte cellulaire, comme observé avec Nurr1. En effet, dans l'article de Saijo *et al* (64), il a été rapporté en utilisant des essais de SUMOylation combinés avec analyse western blot sur des cellules HeLa (lignée cancéreuse provenant du col de l'utérus) exprimant les mutants Nurr1 K91R et K558R (mutations détruisant les sites de SUMOylation) que la lysine-K558 est un site de SUMOylation, mais pas la lysine K91. D'autre part, l'article de Arredondo *et al* (65) indique par des techniques similaires, mais dans les cellules de reins de singe COS-7 que la lysine-91 de Nurr1 serait effectivement SUMOylé et que la lysine-558 ne le serait pas, indiquant donc des modèles de SUMOylation différents selon les types cellulaires.

Notre objectif était d'étudier le potentiel de SUMOylation de Nor-1, et plus particulièrement, sur son site pSuM. Pour ce faire, des essais de SUMOylation par immunoprécipitation ou analyse d'extrait cellulaire total par western blot ont été effectués en présence d'un mutant de Nor-1 où la lysine-137 du site pSuM a été mutée en arginine, l'empêchant ainsi de conjuguer SUMO. On observe que lorsqu'on mute la lysine-137, on perd complètement deux des trois bandes de SUMOylation, et ce, dans les deux types cellulaires (**Figures 8D et 8E**). Ces résultats indiquent que la deuxième et la troisième bande correspondent à la SUMOylation sur le site pSuM de Nor-1. Les deux bandes ainsi perdues au-dessus de Nor-1 avec le mutant K137R sont celles à ~114 et ~135 kDa, et donc les mêmes dont les niveaux ont été amplifiés par PIAS1 dans les cellules 293T (**Figure 6E**) ce qui renforce l'hypothèse que les trois bandes de SUMOylation ne sont pas régulées de la même façon et suggère surtout l'existence probable de plus d'un site de SUMOylation puisque la première bande (~100kDa) est toujours présente avec le mutant K137R. Les candidats pour le ou les sites de SUMOylation non identifiés pourraient être les lysines 89 et 606 situées dans des sites de SUMOylation consensus (**Figure 8B**). Le site contenant la lysine-89 est particulièrement intéressant puisqu'il correspond à un site conservé parmi les trois récepteurs de la famille NR4A. D'autant plus, la lysine-91 de Nurr1, correspondant à la lysine-89 de Nor-1, a été identifiée comme cible de SUMOylation (65).

Un autre détail intéressant est le fait qu'avec le mutant Nor-1 K137R, on observe que la première bande de SUMOylation au-dessus de Nor-1 (~100 kDa) apparaît plus intense comparativement au Nor-1 non muté ce qui pourrait être dû à plusieurs raisons. Par exemple, la disparition de la SUMO du pSuM pourrait mener à un changement de conformation de Nor-1 comme pour l'ADN glycosylase TDG (164). Cela pourrait engendrer un mécanisme de compensation pour la perte de SUMO sur le pSuM ou encore, la lever d'un mécanisme de répression entre les sites de SUMOylation ou pSuM bloquerait la SUMOylation sur l'autre site ou même mener à l'apparition d'une autre modification post-traductionnelle qui était inhibée par la SUMO du pSuM. Les deux premiers cas suggèrent une hiérarchie entre les différents sites de SUMOylation comme cela est observé pour d'autres récepteurs nucléaires possédant plus d'un site de SUMOylation tel que PPAR $\gamma$  et le récepteur des androgènes (178, 179). L'identification d'autres sites potentiels de SUMOylation de Nor-1 ainsi que le mécanisme de régulation possible entre ces sites reste à définir.

Vu les données présentées plus haut et les tailles des trois bandes au-dessus de Nor-1 (~85 kDa), soit : ~100 kDa, ~114 kDa, ~135 kDa, il est tentant de proposer un modèle de SUMOylation de Nor-1 puisque la SUMOylation ajoute environ 20 kDa en western blot, malgré une taille prédite d'environ 12 kDa (180, 181). Selon notre modèle, nous proposons que la première bande de 100 kDa représente une monoSUMOylation sur un site inconnu pour l'instant, la deuxième bande de 114 kDa une monoSUMOylation également, mais sur le site pSuM de Nor-1 et la troisième bande de 135 kDa représente une addition de SUMO(s) supplémentaire(s) donnant une polySUMOylation sur le pSuM. La troisième bande pourrait également être une monoSUMOylation sur un autre site inconnu étant dépendant du site pSuM puisqu'elle disparaît lorsque le pSuM est muté donnant ainsi un modèle avec trois sites monoSUMOylés sur Nor-1. Par contre, d'autres possibilités peuvent également expliquer le profil particulier de Nor-1. En effet, par exemple, lorsque la lysine-137 du pSuM est mutée, on crée un nouveau contexte protéique sans SUMOylation du pSuM. Cela fait qu'il pourrait y avoir apparition d'autres modifications post-traductionnelles que la SUMOylation et donc, la bande restante (~100 kDa) après la mutation K137R pourrait représenter une autre modification post-traductionnelle que la SUMOylation, par exemple de l'acétylation ou de l'ubiquitination. Il a été démontré que la SUMOylation peut bloquer l'acétylation et l'ubiquitination sur des lysines

adjacentes aux sites de SUMOylation, comme c'est le cas pour le facteur de transcription p53 et le suppresseur de tumeur VHL (159, 182). Dans ce cas, le modèle pourrait indiquer qu'il y a plusieurs protéines de SUMO s'accrochant au site pSuM. Une autre possibilité pourrait être une monoSUMOylation sur un site inconnu pour la première bande et une monoSUMOylation sur le pSuM de Nor-1 pour la deuxième bande. Cependant, pour la troisième bande, il pourrait s'agir d'une autre modification post-traductionnelle qui viendrait s'ajouter à la protéine de SUMO du pSuM. Par exemple, il est rapporté que des protéines d'ubiquitination peuvent s'ajouter à des protéines SUMO, comme c'est le cas de PML (protéine de leucémie promyélocytaire) (183, 184). D'autres expériences sont nécessaires pour évaluer les niveaux de SUMOylation et sans doute également d'ubiquitination et d'acétylation en présence des composantes de la machinerie SUMO et de mutants Nor-1 sur d'autres sites potentiels de SUMOylation pour élucider les différentes possibilités. Cependant, en fonction de nos résultats présentés, la première et la deuxième bande au-dessus de Nor-1 représentent très probablement de la SUMOylation. En somme, nous avons démontré que Nor-1 peut effectivement être SUMOylé sur son site pSuM dans un contexte neuronal et qu'il existe probablement plus d'un site de SUMOylation actif sur Nor-1.

Parmi les alternatives possibles pour étudier le potentiel de SUMOylation de Nor-1, nous pourrions effectuer les essais d'immunoprécipitation avec un anticorps ciblant directement Nor-1. En immunoprécipitant directement Nor-1, cela nous permettrait d'étudier la SUMOylation au niveau de Nor-1 endogène. On sait que les cellules neuronales HT22 expriment Nor-1 (donnée non montrée), mais les niveaux sont en général très faibles, limitant l'approche de cibler directement Nor-1 endogène. Une autre possibilité serait d'effectuer des essais de SUMOylation *in vitro* en ajoutant les composantes nécessaires de la machinerie de SUMOylation. Cette approche a permis de valider l'identification des résidus importants au niveau du site pSuM de ER $\beta$  ainsi que de l'extension du pSuM pour maximiser la SUMOylation (7). Avec le rôle du pSuM de Nor-1 et son extension conservée avec ER $\beta$ , ainsi que le rôle possible d'autres sites de SUMOylation (Lys-89 et 606), l'approche *in vitro* serait certainement une possibilité intéressante à considérer.

À l'aide des essais d'immunoprécipitation dans les cellules HEK293T, nos résultats ont permis de déterminer le potentiel de conjugaison de Nor-1 avec les isoformes SUMO-1 et



SUMO-2. En effet, lorsque l'on transfecte GFP-SUMO-1 avec HA-Nor-1 dans les cellules, on observe un déplacement de la première bande de SUMOylation (100 kDa) d'environ 25 kDa, ce qui correspond de près à la taille du GFP ajoutée à SUMO-1 (**Figure 7A**). De plus, le fait que la première bande subit un déplacement correspondant à la taille du GFP de GFP-SUMO-1 renforce l'idée que cette bande à 125 kDa soit effectivement de la SUMOylation. Nous avons validé davantage la présence de SUMO-1 en utilisant un anticorps anti-GFP qui a révélé la bande de 125 kDa apparaissant dans les puits contenant du GFP-SUMO-1. Ces résultats démontrent ainsi que Nor-1 peut se conjuguer à SUMO-1. Des essais d'immunoprécipitation avec FLAG-Nor-1 et des anticorps anti-FLAG ont été utilisés pour démontrer le potentiel de conjugaison de Nor-1 à SUMO-2. La spécificité des anticorps pour Nor-1 est démontrée à la **figure 7C** par l'absence de bande dans le contrôle négatif. La **figure 7C** démontre également que Nor-1 peut conjuguer SUMO-2 puisqu'il y a une bande principale accompagnée de plus petites bandes secondaires qui apparaissent avec l'ajout d'HA-SUMO-2 sur la membrane révélée avec un anticorps anti-HA. Il est intéressant de noter la taille élevée de la bande principale apparaissant avec HA-SUMO-2 qui pourrait s'expliquer par le fait que SUMO-2 peut faire des chaînes, contrairement à SUMO-1, ce qui expliquerait également les bandes à faible intensité que l'on retrouve près de la bande principale (155). Ainsi Nor-1 semble être une cible à la fois de SUMO-1 et SUMO-2. Certains récepteurs nucléaires ont été décrits comme possédant plusieurs sites de SUMOylation comme par exemple ER $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et le récepteur des androgènes AR (178, 179, 185). De plus, certains autres ont été montrés comme pouvant être SUMOylés par plusieurs isoformes de SUMO, par exemple les récepteurs RXR $\alpha$  et ROR $\alpha$  qui peuvent conjuguer SUMO-1 et SUMO-2, corrélant ainsi avec nos observations (186, 187).

Le fait que Nor-1 peut conjuguer SUMO-1 et SUMO-2 vient ajouter des possibilités sur le modèle de SUMOylation endogène à trois bandes de Nor-1. En effet, on pourrait par exemple concevoir une mono SUMOylation de SUMO-1 sur le(s) site(s) non identifié(s) et une poly SUMOylation de SUMO-2 sur le site pSuM puisque celui-ci semble être représenté par plus d'une bande (114 et 135 kDa). Des expériences additionnelles seraient nécessaires afin de déterminer exactement quelles isoformes de SUMO se retrouvent sur quel site. Cependant, nos résultats démontrent le potentiel de Nor-1 à conjuguer à la fois SUMO-1 et SUMO-2.

Comme approches alternatives aux essais d'immunoprécipitation en présence de GFP-SUMO-1 et HA-SUMO-2, nous aurions pu utiliser des anticorps spécifiques pour les différentes isoformes de SUMO pour révéler les membranes après l'immunoprécipitation. Cette approche nous aurait permis d'identifier directement quelles isoformes de SUMO se retrouvent sur Nor-1 de façon endogène et non en surexpression. Nous aurions également pu effectuer des essais de SUMOylation *in vitro*, mais n'utilisant qu'une seule isoforme de SUMO dans les réactions. Cette approche en utilisant des mutants du site pSuM nous permettrait de déterminer la spécificité des isoformes SUMO sur Nor-1. Nous aurions également pu effectuer les mêmes essais d'immunoprécipitation en présence de SENP-3, une protéase du même type que SENP-1, mais qui a une préférence pour SUMO-2/3 et comparer les résultats avec ceux utilisant SENP-1 (**Figure 6.C et 6D**) qui n'a pas de préférence et cible les deux isoformes (145). Cela aurait pu nous indiquer si Nor-1 peut conjuguer de façon endogène SUMO-2.

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription sous le contrôle de différents signaux cellulaires pouvant provoquer des modifications post-traductionnelles faisant parties du mécanisme de régulation de leur activité. Nous avons donc procédé à des essais de gène rapporteur à la luciférase afin de déterminer l'effet de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides d'expression pCMX-Nor-1 et pCMX seul (contrôle négatif), en présence du rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>bluc ainsi que des quantités croissantes de pCMX-SUMO-1 ou de pCMX-SUMO-2. Le rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>bluc consiste en trois éléments de réponse aux Nur/NR4A insérés devant le gène de la luciférase. Tout d'abord, lorsqu'on ajoute Nor-1, on observe une augmentation de l'activité luciférase d'environ 50 fois comparativement au contrôle négatif, ce qui valide la spécificité du rapporteur pour Nor-1 dans ce contexte cellulaire.

L'ajout de SUMO-1 et SUMO-2 dans les essais luciférase augmente de façon significative l'activité de Nor-1 de façon dose dépendante jusqu'à 1,6 fois pour SUMO-1 et jusqu'à 3 fois pour SUMO-2, démontrant que les deux isoformes de SUMO sont efficaces pour augmenter l'activité transcriptionnelle de Nor-1 (**Figures 7B et 7D**). Ces résultats sont spécifiques à Nor-1 puisqu'il n'y a pas de variation significative de l'activité luciférase lorsqu'on ajoute SUMO-1 ou SUMO-2 en présence de pCMX seulement. Il est à noter que les résultats en présence de concentrations élevées de SUMO-1, soit 100 et 200 ng, ne sont pas

présentés à la **figure 7B**, dû à un effet dommageable au niveau de l'intégrité cellulaire dans ces conditions d'excès de SUMO-1. Par contre, il faut rester prudent dans notre interprétation puisque les effets de la SUMOylation observés par l'ajout de SUMO-1 et SUMO-2 pourraient se faire soit par SUMOylation directe de Nor-1 ou soit par SUMOylation indirecte, par exemple sur un cofacteur pouvant réguler l'activité de Nor-1. Il a été démontré que les cofacteurs p160/SRC et p300/CBP peuvent être SUMOylés, favorisant ainsi leur potentiel de coactivation transcriptionnelle (188-190). Avec p160/SRC et p300/CBP pouvant coactiver Nor-1 (section 1.2.2.4), cela suggère que leur SUMOylation respective pourrait résulter en une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 de façon indirecte. D'un autre côté, nous avons démontré que Nor-1 peut effectivement conjuguer SUMO-1 et SUMO-2 (**Figures 7A et 7C**), suggérant que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par les deux isoformes de SUMO pourrait résulter d'un effet direct sur Nor-1, ou encore d'une combinaison entre une SUMOylation directement sur Nor-1 et une SUMOylation sur des cofacteurs de Nor-1.

Pour discerner davantage ces possibilités, nous avons effectué des essais luciférase dans le même contexte cellulaire, mais cette fois, avec les plasmides pCMX-Nor-1-K137R et pCMX-Nor-1-S139A exprimant des formes mutantes de Nor-1 ne pouvant pas être SUMOylées sur le site pSuM. Les résultats de ces essais nous indiquent que les mutants SUMO subissent une baisse d'activité transcriptionnelle de plus de 20% pour la mutation K137R et d'environ 50% pour la mutation S139A (**Figures 8F et 8G**). Ces résultats nous indiquent que la SUMOylation du pSuM de Nor-1 serait importante dans le maintien de l'activité de Nor-1, corrélant avec la possibilité que la SUMOylation directe de Nor-1 participe à la régulation positive de son activité transcriptionnelle. Dans le domaine des récepteurs nucléaires, la SUMOylation a été démontrée comme pouvant être activatrice ou répressive au niveau du potentiel de transcription. En effet, les récepteurs nucléaires RXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , AR et le récepteur de la progestérone PR (178, 179, 187, 191, 192) sont inhibés par la SUMOylation, alors que les récepteurs nucléaires PXR, ER $\alpha$  et ROR $\alpha$  (185, 186, 193) sont activés. Il y a plusieurs possibilités pouvant expliquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 par la SUMOylation. Par exemple, la SUMOylation de Nor-1 sur son site pSuM pourrait augmenter le recrutement d'un coactivateur comme c'est le cas du facteur de transcription PEA3 (194), ou encore augmenter l'habilité de Nor-1 à lier l'ADN comme démontré pour le facteur de transcription HSF-2 (195). De façon

intéressante, il a été démontré que le cofacteur p160/SRC interagit avec la portion N-terminale de Nor-1, au niveau des acides aminés 1 à 112 (49). Cette région de Nor-1 contient le site de SUMOylation potentiel, soit la lysine-89 (**Figure 8.B**). Il serait donc intéressant de valider d'abord si ce site est effectivement SUMOylé et s'il participe au recrutement du coactivateur p160/SRC.

Le potentiel du site pSuM à conjuguer SUMO est conféré par la phosphorylation de la sérine adjacente à la lysine acceptrice du site. Dans le cas de Nor-1, il s'agit de la sérine-139. Nous avons observé que la mutation de cette sérine par une alanine (S139A) altère de façon plus marquée l'activité transcriptionnelle de Nor-1 comparativement à la mutation de la lysine-137. Ces résultats suggèrent un rôle important de régulation pour la sérine-139 où la régulation directe de la SUMOylation du pSuM participe au contrôle de l'activité de Nor-1, mais aussi qu'un autre mécanisme puisse s'ajouter au niveau de cette sérine pour maximiser l'activité de Nor-1. Parmi les possibilités, la phosphorylation sur la sérine-139 pourrait servir au recrutement d'un cofacteur transcriptionnel ou encore réguler l'ajout de nouvelles modifications post-traductionnelles retrouvées sur Nor-1. En résumé, nos résultats démontrent que la SUMOylation de Nor-1 augmente son activité transcriptionnelle et que la SUMOylation du site pSuM est importante pour le maintien de son activité transcriptionnelle de base.

Une alternative envisagée pour les essais luciférase a été d'utiliser le système de gène rapporteur sous le contrôle de l'élément UAS (upstream activating sequence) qui permet de mesurer l'activité de protéine fusionnée avec le site de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL-4. Nous avons généré un plasmide d'expression pCMX-Gal4-Nor-1 pour utiliser dans les cellules HEK293T dans le but de confirmer les résultats obtenus avec le rapporteur (NurRE)<sub>3</sub>Luc. Malheureusement, la réponse à l'expression ectopique de GAL4-Nor-1 dans les cellules HEK293T n'a pas été suffisante pour mesurer une activité adéquate de Nor-1, probablement dû à un changement de conformation de Nor-1 provoqué par l'ajout de l'étiquette GAL4. L'utilisation de ce système nous aurait également permis de mesurer l'activité de Nor-1 spécifiquement dans un contexte où les autres récepteurs de la famille NR4A sont exprimés, comme dans les cellules neuronales HT22. Une autre alternative aurait été d'utiliser un plasmide rapporteur avec le gène de la luciférase précédé par un élément de réponse NBRE (l'autre élément de réponse aux NR4A). Cependant, ce rapporteur répond également aux autres

récepteurs NR4A, mais nous permettrait d'apporter un autre contexte de régulation qui nous permettrait de valider les résultats obtenus.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'objectif de ces travaux est d'étudier la SUMOylation de Nor-1 sur le site pSuM. Tel que démontré au laboratoire, le site pSuM est un site atypique de SUMOylation qui dépend de la phosphorylation de la sérine contenue dans le pSuM pour apporter la charge négative nécessaire au recrutement d'Ubc9 et permettre la SUMOylation de la lysine adjacente (7). Nous avons donc voulu caractériser la régulation de la SUMOylation de Nor-1 par la phosphorylation de la sérine 139 du pSuM afin de déterminer si le fonctionnement du pSuM de Nor-1 est similaire à celui démontré pour ER $\beta$  (7). Avec ce but en tête, nous avons effectué des essais d'immunoprécipitation et des analyses westerns sur des extraits cellulaires complets en présence du mutant S139A de Nor-1 où la sérine-139 du pSuM a été mutée en alanine pour ainsi empêcher sa phosphorylation possible. On a observé que lorsque l'on mute la sérine-139, on perd complètement deux des trois bandes de SUMOylation, soit exactement le même patron obtenu avec le mutant K137R ne pouvant pas conjuguer les protéines de SUMO sur le pSuM et ce, dans les deux types cellulaires (**Figures 8D et 8E**).

De plus, nous avons muté également la sérine-139 par un résidu glutamique (S139E) pour ainsi ajouter une charge négative constitutive dans le but de créer un environnement phospho-mimétique. Les essais d'immunoprécipitation réalisés avec le mutant phospho-mimétique S139E ont démontré que l'intensité des trois bandes de SUMOylation au-dessus de Nor-1 sur le gel est fortement augmentée (**Figure 8F et 8G**). Ces résultats suggèrent que la charge négative apportée par la phosphorylation de la sérine 139 est essentielle pour le processus de SUMOylation du pSuM de Nor-1, concordant ainsi avec le modèle de SUMOylation du pSuM de ER $\beta$  (7). Cependant, selon le modèle actuel, la première bande (~100 kDa) de SUMOylation ne représenterait pas une SUMOylation du pSuM de Nor-1, tel que suggéré par les résultats obtenus avec le mutant K137R (**Figure 8D et 8E**). L'augmentation de son intensité par la mutation S139E pourrait donc s'expliquer par une régulation possible entre les différents sites de SUMOylation de Nor-1, telle que proposée un peu plus haut (page 63). Une régulation directe de la SUMOylation de cet autre site de SUMOylation par la phosphorylation sur la sérine 139 pourrait être également envisagée. Un exemple où la phosphorylation d'une sérine située à distance d'un site de SUMOylation peut induire la SUMOylation se retrouve chez

l'endonucléase FEN-1, sur laquelle la phosphorylation de la sérine 187 favorise la SUMOylation de la lysine 168 (196).

Nous avons tenté de déterminer le mécanisme de fonctionnement du pSuM de Nor-1 en fonction d'identifier le ou les signaux permettant d'induire la SUMOylation par la phosphorylation. La première possibilité envisagée fut de considérer la voie des MAP kinases sur la base des travaux effectués sur ER $\beta$  où l'activation des MAP kinases permet d'induire la SUMOylation du pSuM d'ER $\beta$  (7). Pour ce faire, nous avons réalisé des essais d'immunoprécipitation et analyses westerns sur des extraits cellulaires complets en présence ou absence de RasV12, un mutant de l'oncogène Ras permettant l'activation constitutive des trois voies de signalisation des MAP kinases, soient celles de Erk, Jun et p38. L'efficacité de RasV12 à activer Erk est démontrée à la **figure 9A**, puisque l'on observe une augmentation des niveaux de phosphorylation d'Erk1/2 dans les cellules transfectées. Nos résultats démontrent également que RasV12 augmente l'expression protéique de Nor-1 dans les deux types cellulaires (**Figure 9B et 8C**). Ces résultats suggèrent que la voie des MAPK pourrait avoir un rôle à jouer dans la stabilité de Nor-1. Des expériences additionnelles seraient nécessaires pour déterminer l'effet de la phosphorylation sur la stabilité et la dégradation de Nor-1 et les résidus exacts ciblés par l'activation de Ras, puisqu'il existe plusieurs sites de phosphorylation identifiés pour Nor-1 (voir section 1.2.2.4). En particulier, il a été démontré qu'Erk2 peut phosphoryler Nor-1 (58). Tout comme la SUMOylation, la phosphorylation peut jouer plusieurs rôles sur les protéines cibles et la régulation de la stabilité protéique est l'un d'eux, tel que démontré pour le proto-oncogène MYC où la phosphorylation induite par Ras augmente l'accumulation de la protéine (197). En vertu des nombreux effets induits par l'activation de RasV12 sur les voies des MAP kinases, il faut par contre considérer également que l'effet observé sur l'expression protéique de Nor-1 pourrait être un effet médié de manière indirecte n'impliquant pas de phosphorylation de Nor-1 (198).

Nos résultats ont également démontré que l'ajout de RasV12 dans les deux types cellulaires augmente l'intensité des trois bandes au-dessus de Nor-1 et que l'ajout de SENP-1 confirme que ces trois bandes sont associées à la SUMOylation de Nor-1, suggérant que l'activation de la voie des MAPK potentialise la SUMOylation de Nor-1 (**Figure 9C et 9D**). Les différentes modifications post-traductionnelles ont des relations complexes entre elles

puisqu'elles peuvent s'entre réguler et la SUMOylation et la phosphorylation ne sont pas des exceptions à cette règle. Il y a plusieurs cas dans la littérature où la phosphorylation sur une protéine cible inhibe ou potentialise la SUMOylation de cette même protéine (145). Bien sûr, le cas se rapprochant le plus de nos observations est le cas d'ER $\beta$  où la phosphorylation de la sérine du pSuM est essentielle pour la SUMOylation de ce site (7). De plus, le pSuM de ER $\beta$  possède aussi une extension qui est phosphorylée par GSK-3 $\beta$ , ce qui potentialise davantage la SUMOylation. Nor-1 possède également cette extension qui est conservée (**Figure 8C**), ce qui suggère une possible implication de celle-ci pour potentialiser la SUMOylation de Nor-1 par GSK-3 $\beta$  (7). Il est donc tentant de proposer que la voie des MAPK régule la SUMOylation de Nor-1 en phosphorylant la sérine 139, mais elle peut aussi avoir un impact sur les résidus sérines et thréonines de l'extension du pSuM de Nor-1. Il serait intéressant de déterminer si effectivement une telle régulation est possible au niveau du pSuM de Nor-1. D'autant plus que cette régulation pourrait se faire sur un ou même plusieurs sites de phosphorylation de Nor-1, puisque celui-ci possède plusieurs sérines et tyrosines phosphorylables (voir section 1.2.2.4), dont certaines loin des sites de SUMOylation de Nor-1, comme dans le cas de l'endonucléase FEN-1 décrit plus haut (196). Cela pourrait alors expliquer pourquoi l'intensité des trois bandes de SUMOylation est augmentée et non seulement celle des deux reliées aux pSuM. En somme, il y a une augmentation de l'état global de SUMOylation de Nor-1 engendré par l'activation des voies des MAPK.

Il est intéressant de noter que RasV12 fait augmenter l'expression protéique de Nor-1 ainsi que son état global de SUMOylation. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que cette augmentation des niveaux protéiques est peut-être due à une stabilisation de Nor-1 dans un mécanisme SUMO-dépendant. C'est le cas de certaines protéines comme le suppresseur de tumeur (SMAD4) et le récepteur nucléaire ER $\beta$  qui sont stabilisés par la conjugaison de SUMO qui antagonise leur ubiquitination et par le fait même, leur dégradation par le protéasome (7, 199). Par contre, comme nous l'avons expliqué un peu plus haut (page 70), cette augmentation de l'expression protéique de Nor-1 par la phosphorylation pourrait également se faire via un mécanisme indépendant de la SUMOylation où la voie des MAPK pourrait cibler des résidus différents incluant la sérine-139 qui auraient alors un impact sélectif sur la régulation de Nor-1. En somme, nous avons démontré que la sérine-139 du pSuM est essentielle au processus de

SUMOylation de Nor-1 et que l'expression protéique de Nor-1 ainsi que son état global de SUMOylation sont augmentés par la voie des MAPK. Le mécanisme exact de SUMOylation sur d'autres sites potentiels ainsi que l'implication d'autres sites de phosphorylation possiblement impliqués dans la régulation de Nor-1 restent à être mieux définis.

Finalement, afin de vérifier si la SUMOylation du pSUM de Nor-1 affecte l'expression de ses gènes cibles, nous avons procédé à un essai de PCR quantitative sur les cellules HT22. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides pCMX (contrôle négatif), pCMX-Nor-1 ou pCMX-Nor-1-K137R et les niveaux d'ARN messager de l'énolase-3 (ENO3) ont été mesurés. Le gène ENO3 est considéré comme étant une cible de Nor-1 puisqu'il possède des éléments de réponses NBRE spécifiques aux récepteurs NR4A (NBRE) au niveau de son promoteur qui confèrent une activation de la transcription de ENO3 par Nor-1 (122). L'énolase-3 est l'une des isoenzymes du complexe de l'énolase qui inclut également l'énolase  $\gamma$  spécifique aux neurones et l'énolase  $\alpha$  non neuronale (200, 201). L'énolase-3 est surtout retrouvée dans les tissus musculaires et est également connue sous le nom d'énolase bêta (200). Puisque nous utilisons une lignée neuronale, nous avons d'abord déterminé au moyen d'une courbe standard réalisée par qPCR que l'ARNm de l'énolase-3 était effectivement exprimé dans les cellules HT22, ce qui était bien le cas (données non montrées). De plus, nos résultats montrent une augmentation de 3,3 fois des niveaux d'ARNm d'ENO3 en réponse à l'expression de Nor-1 (**Figure 10**), suggérant que Nor-1 peut effectivement réguler l'expression de ce gène. En comparaison, l'addition du mutant K137R de Nor-1 a mené à une moins grande augmentation de l'expression de ENO3 (~2,4 fois), suggérant que la SUMOylation du pSUM de Nor-1 joue un rôle important dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Nor-1 et de l'expression de ses gènes cibles. Ces résultats concordent avec ceux obtenus en essais luciférase où la mutation K137R diminue l'activité transcriptionnelle de Nor-1 (**Figure 10**).

L'énolase, aussi connue sous le nom de phosphopyruvate hydratase, est une enzyme impliquée dans la glycolyse qui catalyse la conversion du 2-phospho-D-glycérate (2PG) en phosphoénolpyruvate (PEP) ainsi que la réaction inverse (202). L'énolase est donc directement impliquée dans la production d'énergie des cellules (202). La régulation de l'énolase par Nor-1 et l'implication de la SUMOylation dans ce processus au niveau des cellules neuronales HT22 semble suggérer un rôle important de la SUMOylation de Nor-1 dans le



métabolisme énergétique des cellules neuronales. Bien sûr nos données sont préliminaires et des expériences additionnelles sur d'autres cibles de Nor-1 et d'autres marqueurs de l'état énergétique de la cellule sont nécessaires. Néanmoins, nous démontrons que la SUMOylation du pSuM de Nor-1 affecte l'expression d'un de ses gènes cibles directement impliqués dans le processus de glycolyse, ce qui suggère un rôle de la SUMOylation de Nor-1 dans le métabolisme énergétique des neurones.

Parmi les alternatives possibles pour valider les résultats obtenus des essais de PCR quantitative, il serait intéressant d'effectuer des essais d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pour déterminer la liaison à l'ADN de Nor-1 comparativement au mutant K137R au niveau des régions promotrices des gènes cibles. Cet essai nous permettrait de déterminer le rôle de la SUMOylation du pSuM à recruter Nor-1 aux gènes cibles, donnant ainsi une indication de sa capacité à réguler la transcription des gènes cibles. La validation des résultats d'expression génique peut se faire également par des essais westerns blot pour vérifier les niveaux protéiques respectifs. Nous pourrions également réaliser les essais de PCR quantitative avec des lignées cellulaires infectées par lentivirus pour favoriser l'expression constitutive de la forme sauvage ou mutante K137R de Nor-1, et pour invalider l'expression endogène de Nor-1 par la stratégie utilisant les shRNAs.

## **4.1 Conclusions et perspectives**

Lors de ce travail, nos objectifs étaient de déterminer le potentiel de SUMOylation de Nor-1 sur son site de SUMOylation atypique pSuM dans les neurones ainsi que de caractériser l'effet de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1 et l'expression de ces gènes cibles. Nos résultats ont effectivement démontré que Nor-1 peut être SUMOylé sur son site pSuM et probablement sur un autre site vu le patron à trois bandes associées à la SUMOylation observée. De plus, il a été démontré dans ce travail que Nor-1 peut conjuguer deux isoformes de SUMO, soit SUMO-1 et SUMO-2. Les résultats des essais luciférase indiquent que la SUMOylation a un effet activateur sur Nor-1 et que la SUMOylation de son site pSuM est essentielle pour le maintien de son activité transcriptionnelle de base. La régulation de la SUMOylation du site pSuM a également été étudiée et les résultats indiquent que la phosphorylation de la sérine-139 est essentielle pour la SUMOylation du pSuM, comme c'est

le cas également pour ER $\beta$  (7). De plus, nous avons identifié la voie des MAP kinase comme étant impliquée dans la régulation de l'expression protéique et de la SUMOylation de Nor-1, apportant un mécanisme fonctionnel de phosphorylation du pSuM. Nos résultats suggèrent également que la SUMOylation du pSuM de Nor-1 affecte l'expression de ses gènes cibles, comme cela est démontré pour l'énolase-3, et supportent un rôle de la SUMOylation de Nor-1 dans la régulation du métabolisme des neurones.

Plusieurs approches additionnelles sont envisagées pour investiguer davantage le rôle de la SUMOylation du récepteur Nor-1. Il serait intéressant de générer des mutants pour les deux autres sites de SUMOylation potentiels de Nor-1, soit K89 et K606, et d'effectuer des essais d'immunoprécipitation et analyses westerns afin de déterminer leur implication respective sur la SUMOylation de Nor-1 ainsi que d'identifier le site responsable de la première bande de SUMOylation à 100 kDa. Une autre avenue intéressante serait d'utiliser des anticorps spécifiques aux isoformes de SUMO afin de déterminer quelles isoformes sont capables de conjuguer Nor-1 et d'identifier sur quel site avec les mutants des différents sites potentiels de SUMOylation. En utilisant les essais luciférase, la première chose à faire serait de valider les résultats trouvés dans les HEK293T dans les cellules neuronales HT22. Le système UAS $\kappa$ Luc avec les GAL4-Nor-1 pourrait être intéressant à utiliser dans les HT22 puisqu'il permettrait d'être spécifique à Nor-1 c'est-à-dire qu'il n'y aura pas d'interférence causée par les deux autres membres de sa famille. Ensuite, pour expliquer l'effet de la SUMOylation sur l'activité transcriptionnelle de Nor-1, des essais de co-immunoprécipitation de Nor-1 sauvage et mutant sumo déficient avec des cofacteurs interagissant avec Nor-1 pourrait s'avérer intéressant. Tel que discuté plus tôt (section 4), il nous faudrait générer des mutants spécifiques pour les sites de phosphorylation correspondants à l'extension du pSuM de Nor-1, et également pour d'autres sites potentiels de phosphorylation, afin de déterminer leur rôle respectif sur la réponse à RasV12 et sur le potentiel de SUMOylation de Nor-1. Pour ce qui est de l'influence de la SUMOylation sur l'expression des gènes cibles de Nor-1, il faudrait générer des lignées cellulaires neuronales exprimant de façon constitutive Nor-1 de type sauvage ou muté à l'aide de l'approche par lentivirus ou encore au moyen du système CRISPR et caspase pour ensuite effectuer des essais de PCR quantitative afin d'analyser l'expression de gènes cibles impliqués dans le métabolisme énergétique. Également d'autres gènes potentiellement ciblés par Nor-1,

tels que la protéine inhibitrice d'apoptose cIAP2 (203) et la tyrosine hydroxylase impliquée dans la synthèse de la dopamine (87) sont à considérer.

En conclusion, nos résultats démontrent que le pSuM de Nor-1 est une cible de la SUMOylation, que la régulation de sa SUMOylation semble très similaire à celle d'ER $\beta$  avec la voie des MAPK comme inducteur et que cette SUMOylation affecte l'activité transcriptionnelle de Nor-1 ainsi que l'expression de ses gènes cibles. Ce travail permet d'étendre le rôle du pSuM comme nouveau mécanisme de régulation des récepteurs nucléaires par la SUMOylation, puisqu'il n'y avait jusqu'à présent qu'un seul exemple de ce processus dans la littérature. De plus, cette étude permet d'identifier la SUMOylation comme une composante importante de la régulation de l'activité de Nor-1 avec le potentiel de réguler plusieurs processus biologiques associés à Nor-1, par exemple le métabolisme du glucose, l'athérosclérose ainsi que la survie neuronale (22, 101, 120, 133). L'identification et la compréhension de nouveaux mécanismes de régulation de l'activité de Nor-1 deviennent importantes dans le cadre des maladies neurodégénératives, comme le Parkinson, l'Alzheimer et scléroses multiples.

## 5. Bibliographie

1. Chambon P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Molecular endocrinology*. 2005;19(6):1418-28.
2. Nuclear Receptors Nomenclature C. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97(2):161-3.
3. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(172):111-38.
4. Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*. 2003;423(6939):555-60.
5. Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 13):2363-73.
6. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(7):542-54.
7. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(14):2709-21.
8. Kim DH, Xiao Z, Kwon S, Sun X, Ryerson D, Tkac D, et al. A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity. *The EMBO journal*. 2015;34(2):184-99.
9. Balasubramanian N, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Direct methylation of FXR by Set7/9, a lysine methyltransferase, regulates the expression of FXR target genes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;302(9):G937-47.
10. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *The EMBO journal*. 1992;11(3):1003-13.
11. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends in biochemical sciences*. 2004;29(6):317-24.
12. Hazel TG, Nathans D, Lau LF. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(22):8444-8.
13. Milbrandt J. Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron*. 1988;1(3):183-8.
14. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW. Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Molecular endocrinology*. 1992;6(12):2129-35.
15. Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K. Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;205(3):1959-65.
16. Maxwell MA, Muscat GE. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nuclear receptor signaling*. 2006;4:e002.
17. Ohkura N, Ito M, Tsukada T, Sasaki K, Yamaguchi K, Miki K. Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene*. 1998;211(1):79-85.

18. Labelle Y, Zucman J, Stenman G, Kindblom LG, Knight J, Turc-Carel C, et al. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Human molecular genetics*. 1995;4(12):2219-26.
19. Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T. Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Molecular endocrinology*. 1996;10(12):1656-66.
20. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006;126(4):789-99.
21. Kim SG, Lee B, Kim DH, Kim J, Lee S, Lee SK, et al. Control of energy balance by hypothalamic gene circuitry involving two nuclear receptors, neuron-derived orphan receptor 1 and glucocorticoid receptor. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(19):3826-34.
22. Ponnio T, Conneely OM. nor-1 regulates hippocampal axon guidance, pyramidal cell survival, and seizure susceptibility. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(20):9070-8.
23. Helbling JC, Minni AM, Pallet V, Moisan MP. Stress and glucocorticoid regulation of NR4A genes in mice. *Journal of neuroscience research*. 2014;92(7):825-34.
24. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*. 1991;252(5010):1296-300.
25. Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science*. 1992;256(5053):107-10.
26. Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(11):7549-57.
27. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, et al. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(10):5946-51.
28. Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes & development*. 1995;9(7):769-82.
29. Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, Drouin J. Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology*. 2005;19(4):885-97.
30. Flaig R, Greschik H, Peluso-Iltis C, Moras D. Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(19):19250-8.
31. Kagaya S, Ohkura N, Tsukada T, Miyagawa M, Sugita Y, Tsujimoto G, et al. Prostaglandin A2 acts as a transactivator for NOR1 (NR4A3) within the nuclear receptor superfamily. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2005;28(9):1603-7.
32. Brady SF, Wagenaar MM, Singh MP, Janso JE, Clardy J. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Org Lett*. 2000;2(25):4043-6.
33. Wang WJ, Wang Y, Chen HZ, Xing YZ, Li FW, Zhang Q, et al. Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway. *Nat Chem Biol*. 2014;10(2):133-40.
34. Liu JJ, Zeng HN, Zhang LR, Zhan YY, Chen Y, Wang Y, et al. A unique pharmacophore for activation of the nuclear orphan receptor Nur77 in vivo and in vitro. *Cancer research*. 2010;70(9):3628-37.

35. Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, et al. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol.* 2012;8(11):897-904.
36. Lee SO, Li X, Hedrick E, Jin UH, Tjalkens RB, Backos DS, et al. Diindolylmethane analogs bind NR4A1 and are NR4A1 antagonists in colon cancer cells. *Molecular endocrinology.* 2014;28(10):1729-39.
37. Safe S, Jin UH, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2015.
38. Miller XHaW. A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *Advances in Applied Mathematics.* 1991;12(337-357).
39. Ordelheide AM, Gerst F, Rothfuss O, Heni M, Haas C, Thielker I, et al. Nor-1, a novel incretin-responsive regulator of insulin genes and insulin secretion. *Molecular metabolism.* 2013;2(3):243-55.
40. Nogueira EF, Vargas CA, Otis M, Gallo-Payet N, Bollag WB, Rainey WE. Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. *Journal of molecular endocrinology.* 2007;39(6):365-74.
41. Bandoh S, Tsukada T, Maruyama K, Ohkura N, Yamaguchi K. Gene expression of NOR-1, a neuron-derived orphan receptor, is inducible in neuronal and other cell lineages in culture. *Molecular and cellular endocrinology.* 1995;115(2):227-30.
42. Nomiya T, Nakamachi T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Ohkura N, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of biological chemistry.* 2006;281(44):33467-76.
43. Rius J, Martinez-Gonzalez J, Crespo J, Badimon L. NOR-1 is involved in VEGF-induced endothelial cell growth. *Atherosclerosis.* 2006;184(2):276-82.
44. Borghaei RC, Sinai RS, Mochan E, Pease EA. Induction of mitogen-inducible nuclear orphan receptor by interleukin 1 in human synovial and gingival fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications.* 1998;251(1):334-8.
45. Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2006;147(11):5217-27.
46. Tessem JS, Moss LG, Chao LC, Arlotto M, Lu D, Jensen MV, et al. Nkx6.1 regulates islet beta-cell proliferation via Nr4a1 and Nr4a3 nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(14):5242-7.
47. Bandoh S, Tsukada T, Maruyama K, Ohkura N, Yamaguchi K. Mechanical agitation induces gene expression of NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines. *Leukemia.* 1997;11(9):1453-8.
48. Zhao Y, Nomiya T, Findeisen HM, Qing H, Aono J, Jones KL, et al. Epigenetic regulation of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 by histone acetylation. *FEBS letters.* 2014;588(24):4825-30.
49. Maira M, Martens C, Batsche E, Gauthier Y, Drouin J. Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment. *Molecular and cellular biology.* 2003;23(3):763-76.

50. van Tiel CM, Kurakula K, Koenis DS, van der Wal E, de Vries CJ. Dual function of Pin1 in NR4A nuclear receptor activation: enhanced activity of NR4As and increased Nur77 protein stability. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1823(10):1894-904.
51. Wansa KD, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(27):24776-90.
52. Rambaud J, Desroches J, Balsalobre A, Drouin J. TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(21):14147-56.
53. Kurakula K, van der Wal E, Geerts D, van Tiel CM, de Vries CJ. FHL2 protein is a novel co-repressor of nuclear receptor Nur77. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(52):44336-43.
54. Koch BJ, Ryan JF, Baxevanis AD. The diversification of the LIM superclass at the base of the metazoa increased subcellular complexity and promoted multicellular specialization. *PloS one*. 2012;7(3):e33261.
55. Laflamme C, Filion C, Bridge JA, Ladanyi M, Goldring MB, Labelle Y. The homeotic protein Six3 is a coactivator of the nuclear receptor NOR-1 and a corepressor of the fusion protein EWS/NOR-1 in human extraskeletal myxoid chondrosarcomas. *Cancer research*. 2003;63(2):449-54.
56. Ohkura N, Ohkubo T, Maruyama K, Tsukada T, Yamaguchi K. The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3. *Developmental neuroscience*. 2001;23(1):17-24.
57. Campos-Melo D, Galleguillos D, Sanchez N, Gysling K, Andres ME. Nur transcription factors in stress and addiction. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2013;6:44.
58. Slagsvold HH, Ostvold AC, Fallgren AB, Paulsen RE. Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;291(5):1146-50.
59. Sharma K, D'Souza RC, Tyanova S, Schaab C, Wisniewski JR, Cox J, et al. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell reports*. 2014;8(5):1583-94.
60. Wingate AD, Campbell DG, Pegg M, Arthur JS. Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 3):715-24.
61. Uhlmann T, Geoghegan VL, Thomas B, Ridlova G, Trudgian DC, Acuto O. A method for large-scale identification of protein arginine methylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2012;11(11):1489-99.
62. Kang SA, Na H, Kang HJ, Kim SH, Lee MH, Lee MO. Regulation of Nur77 protein turnover through acetylation and deacetylation induced by p300 and HDAC1. *Biochemical pharmacology*. 2010;80(6):867-73.
63. Malewicz M, Kadkhodaei B, Kee N, Volakakis N, Hellman U, Viktorsson K, et al. Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes & development*. 2011;25(19):2031-40.
64. Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. 2009;137(1):47-59.

65. Arredondo C, Orellana M, Vecchiola A, Pereira LA, Galdames L, Andres ME. PIASgamma enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. *PloS one*. 2013;8(1):e55035.
66. Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*. 1997;276(5310):248-50.
67. Maltais A, Filion C, Labelle Y. The AF2 domain of the orphan nuclear receptor TEC is essential for the transcriptional activity of the oncogenic fusion protein EWS/TEC. *Cancer letters*. 2002;183(1):87-94.
68. Ponnio T, Burton Q, Pereira FA, Wu DK, Conneely OM. The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(3):935-45.
69. DeYoung RA, Baker JC, Cado D, Winoto A. The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(47):47104-9.
70. Stevanato L, Sinden JD. The effects of microRNAs on human neural stem cell differentiation in two- and three-dimensional cultures. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(2):49.
71. Laflamme C, Filion C, Labelle Y. Functional characterization of SIX3 homeodomain mutations in holoprosencephaly: interaction with the nuclear receptor NR4A3/NOR1. *Human mutation*. 2004;24(6):502-8.
72. Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*. 2000;11(9):1991-6.
73. Ashbrook DG, Delprato A, Grellmann C, Klein M, Wetzel R, Overall RW, et al. Transcript co-variance with Nestin in two mouse genetic reference populations identifies Lef1 as a novel candidate regulator of neural precursor cell proliferation in the adult hippocampus. *Front Neurosci*. 2014;8:418.
74. Murphy EP, Conneely OM. Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Molecular endocrinology*. 1997;11(1):39-47.
75. Drouin J, Maira M, Philips A. Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1998;65(1-6):59-63.
76. Fernandez PM, Brunel F, Jimenez MA, Saez JM, Cereghini S, Zakin MM. Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 2000;141(7):2392-400.
77. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev*. 1984;5(1):1-24.
78. Xiao Q, Castillo SO, Nikodem VM. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience*. 1996;75(1):221-30.
79. Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L. Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain research Molecular brain research*. 1996;41(1-2):111-20.



80. Werme M, Olson L, Brene S. NGFI-B and nor1 mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats. *Brain research Molecular brain research*. 2000;76(1):18-24.
81. Werme M, Ringholm A, Olson L, Brene S. Differential patterns of induction of NGFI-B, Nor1 and c-fos mRNAs in striatal subregions by haloperidol and clozapine. *Brain research*. 2000;863(1-2):112-9.
82. Chergui K, Svenningsson P, Nomikos GG, Gonon F, Fredholm BB, Svennson TH. Increased expression of NGFI-A mRNA in the rat striatum following burst stimulation of the medial forebrain bundle. *The European journal of neuroscience*. 1997;9(11):2370-82.
83. Gilbert F, Morissette M, St-Hilaire M, Paquet B, Rouillard C, Di Paolo T, et al. Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry*. 2006;60(6):538-47.
84. Perlmann T, Wallen-Mackenzie A. Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell and tissue research*. 2004;318(1):45-52.
85. Smidt MP, Smits SM, Burbach JP. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol*. 2003;480(1-3):75-88.
86. Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, et al. Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(50):15923-32.
87. Eells JB, Wilcots J, Sisk S, Guo-Ross SX. NR4A gene expression is dynamically regulated in the ventral tegmental area dopamine neurons and is related to expression of dopamine neurotransmission genes. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2012;46(3):545-53.
88. Cadet JL, Brannock C, Krasnova IN, Ladenheim B, McCoy MT, Chou J, et al. Methamphetamine-induced dopamine-independent alterations in striatal gene expression in the 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats. *PloS one*. 2010;5(12):e15643.
89. Saint-Preux F, Bores LR, Tulloch I, Ladenheim B, Kim R, Thanos PK, et al. Chronic co-administration of nicotine and methamphetamine causes differential expression of immediate early genes in the dorsal striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuroscience*. 2013;243:89-96.
90. Koya E, Spijker S, Voorn P, Binnekade R, Schmidt ED, Schoffelmeer AN, et al. Enhanced cortical and accumbal molecular reactivity associated with conditioned heroin, but not sucrose-seeking behaviour. *Journal of neurochemistry*. 2006;98(3):905-15.
91. Maheux J, Ethier I, Rouillard C, Levesque D. Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;313(1):460-73.
92. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(14):5274-8.
93. Nielsen DA, Ji F, Yuferov V, Ho A, Chen A, Levran O, et al. Genotype patterns that contribute to increased risk for or protection from developing heroin addiction. *Mol Psychiatry*. 2008;13(4):417-28.
94. Bannon MJ, Pruetz B, Manning-Bog AB, Whitty CJ, Michelhaugh SK, Sacchetti P, et al. Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine

- abusers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(9):6382-5.
95. Horvath MC, Kovacs GG, Kovari V, Majtenyi K, Hurd YL, Keller E. Heroin abuse is characterized by discrete mesolimbic dopamine and opioid abnormalities and exaggerated nuclear receptor-related 1 transcriptional decline with age. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(49):13371-5.
  96. Akiyama K, Isao T, Ide S, Ishikawa M, Saito A. mRNA expression of the Nurr1 and NGFI-B nuclear receptor families following acute and chronic administration of methamphetamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(8):1957-66.
  97. Schaffer DJ, Tunc-Ozcan E, Shukla PK, Volenec A, Redei EE. Nuclear orphan receptor Nor-1 contributes to depressive behavior in the Wistar-Kyoto rat model of depression. *Brain research*. 2010;1362:32-9.
  98. Rojas P, Joodmardi E, Perlmann T, Ogren SO. Rapid increase of Nurr1 mRNA expression in limbic and cortical brain structures related to coping with depression-like behavior in mice. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(10):2284-93.
  99. Buervenich S, Carmine A, Arvidsson M, Xiang F, Zhang Z, Sydow O, et al. NURR1 mutations in cases of schizophrenia and manic-depressive disorder. *Am J Med Genet*. 2000;96(6):808-13.
  100. Mengozzi M, Cervellini I, Villa P, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, et al. Erythropoietin-induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9617-22.
  101. Volakakis N, Kadkhodaei B, Joodmardi E, Wallis K, Panman L, Silvaggi J, et al. NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(27):12317-22.
  102. Zhang W, Zhu X, Liu Y, Chen M, Yan S, Mao X, et al. Nur77 Was Essential for Neurite Outgrowth and Involved in Schwann Cell Differentiation After Sciatic Nerve Injury. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2015;57(1):38-47.
  103. Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, et al. Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(7):4013-8.
  104. Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nature genetics*. 2003;33(1):85-9.
  105. Bensinger SJ, Tontonoz P. A Nurr1 pathway for neuroprotection. *Cell*. 2009;137(1):26-8.
  106. Kon T, Miki Y, Tanji K, Mori F, Tomiyama M, Toyoshima Y, et al. Localization of nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3) in Lewy body disease and multiple system atrophy. *Neuropathology*. 2015;35(6):503-9.
  107. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
  108. Chen L, Feany MB. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nature neuroscience*. 2005;8(5):657-63.

109. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997;388(6645):839-40.
110. Ohta H, Terao Y, Shintani Y, Kiyota Y. Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neuroscience research*. 2007;57(3):424-33.
111. Newman SJ, Bond B, Crook B, Darker J, Edge C, Maycox PR. Neuron-specific localisation of the TR3 death receptor in Alzheimer's disease. *Brain research*. 2000;857(1-2):131-40.
112. McMorrow JP, Murphy EP. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochemical Society transactions*. 2011;39(2):688-93.
113. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1535-41.
114. Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *The EMBO journal*. 1997;16(8):1865-75.
115. Nomiya T, Zhao Y, Gizard F, Findeisen HM, Heywood EB, Jones KL, et al. Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation*. 2009;119(4):577-86.
116. . !!! INVALID CITATION !!! {Broehm, 2014 #1290;Benini, 2014 #1506;Filion, 2012 #1507;Attwooll, 1999 #1706}.
117. Attwooll C, Tariq M, Harris M, Coyne JD, Telford N, Varley JM. Identification of a novel fusion gene involving hTAFII68 and CHN from a t(9;17)(q22;q11.2) translocation in an extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Oncogene*. 1999;18(52):7599-601.
118. Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinojima Y, Igarashi J, et al. Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpGi methylation within the third exon. *International journal of oncology*. 2014;44(5):1669-77.
119. Mullican SE, Zhang S, Konopleva M, Ruvolo V, Andreeff M, Milbrandt J, et al. Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nature medicine*. 2007;13(6):730-5.
120. Fu Y, Luo L, Luo N, Zhu X, Garvey WT. NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(43):31525-33.
121. Gao W, Fu Y, Yu C, Wang S, Zhang Y, Zong C, et al. Elevation of NR4A3 expression and its possible role in modulating insulin expression in the pancreatic beta cell. *PloS one*. 2014;9(3):e91462.
122. Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nature medicine*. 2006;12(9):1048-55.
123. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992;15(3):318-68.
124. Kumar N, Liu D, Wang H, Robidoux J, Collins S. Orphan nuclear receptor NOR-1 enhances 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent uncoupling protein-1 gene transcription. *Molecular endocrinology*. 2008;22(5):1057-64.
125. Pearen MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2008;149(6):2853-65.

126. Pearen MA, Eriksson NA, Fitzsimmons RL, Goode JM, Martel N, Andrikopoulos S, et al. The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Molecular endocrinology*. 2012;26(3):372-84.
127. Pearen MA, Goode JM, Fitzsimmons RL, Eriksson NA, Thomas GP, Cowin GJ, et al. Transgenic muscle-specific Nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. *Molecular endocrinology*. 2013;27(11):1897-917.
128. Pirih FQ, Nervina JM, Pham L, Aghaloo T, Tetradis S. Parathyroid hormone induces the nuclear orphan receptor NOR-1 in osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;306(1):144-50.
129. Lammi J, Aarnisalo P. FGF-8 stimulates the expression of NR4A orphan nuclear receptors in osteoblasts. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;295(1-2):87-93.
130. Rodriguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, Alonso J, Ferran B, Marti I, et al. [The nuclear receptor NOR-1 regulates the activation of vascular cells and vascular remodelling in response to hemodynamic stress]. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*. 2014;26(2):66-75.
131. Rodriguez-Calvo R, Ferran B, Alonso J, Marti-Pamies I, Aguilo S, Calvayrac O, et al. NR4A receptors up-regulate the antiproteinase alpha-2 macroglobulin (A2M) and modulate MMP-2 and MMP-9 in vascular smooth muscle cells. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;113(6):1323-34.
132. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
133. Zhao Y, Howatt DA, Gizard F, Nomiya T, Findeisen HM, Heywood EB, et al. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circulation research*. 2010;107(4):501-11.
134. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(32):29256-62.
135. de Vries CJ, van Achterberg TA, Horrevoets AJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(31):23939-47.
136. Bonta PI, Pols TW, de Vries CJ. NR4A nuclear receptors in atherosclerosis and vein-graft disease. *Trends in cardiovascular medicine*. 2007;17(3):105-11.
137. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Molecular endocrinology*. 2006;20(4):786-94.
138. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, et al. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(10):2288-94.
139. Calvayrac O, Rodriguez-Calvo R, Marti-Pamies I, Alonso J, Ferran B, Aguilo S, et al. NOR-1 modulates the inflammatory response of vascular smooth muscle cells by preventing NFkappaB activation. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;80:34-44.
140. Lundquist A, Calounova G, Wensman H, Ronnberg E, Pejler G. Differential regulation of Nr4a subfamily nuclear receptors following mast cell activation. *Molecular immunology*. 2011;48(15-16):1753-61.

141. Ohkubo T, Ohkura N, Maruyama K, Sasaki K, Nagasaki K, Hanzawa H, et al. Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Molecular and cellular endocrinology*. 2000;162(1-2):151-6.
142. Wiiger MT, Bideli H, Fodstad O, Flatmark K, Andersson Y. The MOC31PE immunotoxin reduces cell migration and induces gene expression and cell death in ovarian cancer cells. *Journal of ovarian research*. 2014;7:23.
143. Park JI, Park HJ, Lee YI, Seo YM, Chun SY. Regulation of NGFI-B expression during the ovulatory process. *Molecular and cellular endocrinology*. 2003;202(1-2):25-9.
144. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *The Journal of cell biology*. 1996;135(6 Pt 1):1457-70.
145. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical journal*. 2010;428(2):133-45.
146. Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(16):12654-9.
147. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, et al. Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Molecular cell*. 2010;39(4):641-52.
148. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(1):45-50.
149. Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *The EMBO journal*. 2006;25(21):5083-93.
150. Cesaro L, Pinna LA, Salvi M. A Comparative Analysis and Review of lysyl Residues Affected by Posttranslational Modifications. *Curr Genomics*. 2015;16(2):128-38.
151. Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(40):14373-8.
152. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(23):16117-27.
153. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:357-85.
154. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(9):6252-8.
155. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JM, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(38):35368-74.
156. Hsiao HH, Meulmeester E, Frank BT, Melchior F, Urlaub H. "ChopNSpice," a mass spectrometric approach that allows identification of endogenous small ubiquitin-like modifier-conjugated peptides. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2009;8(12):2664-75.
157. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature genetics*. 2004;36(8):837-41.

158. Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M. Function and regulation of SUMO proteases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(12):755-66.
159. Wu SY, Chiang CM. Crosstalk between sumoylation and acetylation regulates p53-dependent chromatin transcription and DNA binding. *The EMBO journal*. 2009;28(9):1246-59.
160. Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Korner R, Olsen JV, et al. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(3):264-9.
161. Kerscher O. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO reports*. 2007;8(6):550-5.
162. Yang SH, Sharrocks AD. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Molecular cell*. 2004;13(4):611-7.
163. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(12):947-56.
164. Baba D, Maita N, Jee JG, Uchimura Y, Saitoh H, Sugasawa K, et al. Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature*. 2005;435(7044):979-82.
165. Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *The EMBO journal*. 2002;21(6):1456-64.
166. Steinacher R, Schar P. Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Current biology : CB*. 2005;15(7):616-23.
167. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Molecular cell*. 2005;18(1):1-12.
168. Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes & development*. 2001;15(23):3088-103.
169. Datwyler AL, Lattig-Tunnemann G, Yang W, Paschen W, Lee SL, Dirnagl U, et al. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2011;31(11):2152-9.
170. Lee YJ, Castri P, Bembry J, Maric D, Auh S, Hallenbeck JM. SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(1):257-67.
171. Lee YJ, Mou Y, Maric D, Klimanis D, Auh S, Hallenbeck JM. Elevated global SUMOylation in Ubc9 transgenic mice protects their brains against focal cerebral ischemic damage. *PloS one*. 2011;6(10):e25852.
172. Zhang YQ, Sarge KD. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;374(4):673-8.
173. Fei E, Jia N, Yan M, Ying Z, Sun Q, Wang H, et al. SUMO-1 modification increases human SOD1 stability and aggregation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;347(2):406-12.
174. Dangoumau A, Veyrat-Durebex C, Blasco H, Praline J, Corcia P, Andres CR, et al. Protein SUMOylation, an emerging pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *The International journal of neuroscience*. 2013;123(6):366-74.

175. Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, et al. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*. 2004;304(5667):100-4.
176. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
177. Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(5):3355-9.
178. Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(28):29551-7.
179. Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14145-50.
180. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ET. Identification of three major sentrinization sites in PML. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(41):26675-82.
181. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*. 1997;88(1):97-107.
182. Cai Q, Robertson ES. Ubiquitin/SUMO modification regulates VHL protein stability and nucleocytoplasmic localization. *PloS one*. 2010;5(9).
183. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nature cell biology*. 2008;10(5):538-46.
184. Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, et al. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nature cell biology*. 2008;10(5):547-55.
185. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Molecular endocrinology*. 2005;19(11):2671-84.
186. Hwang EJ, Lee JM, Jeong J, Park JH, Yang Y, Lim JS, et al. SUMOylation of RORalpha potentiates transcriptional activation function. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;378(3):513-7.
187. Lee WP, Jena S, Rodriguez EP, O'Donovan SP, Wagner C, Jurutka PW, et al. Distinct functional modes of SUMOylation for retinoid X receptor alpha. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(1):195-200.
188. Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, et al. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Molecular cell*. 2003;11(4):1043-54.
189. Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E. Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(14):12335-43.
190. Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(33):30283-8.

191. Lyst MJ, Stancheva I. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 6):1389-92.
192. Abdel-Hafiz H, Dudevoir ML, Horwitz KB. Mechanisms underlying the control of progesterone receptor transcriptional activity by SUMOylation. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(14):9099-108.
193. Priyanka, Kotiya D, Rana M, Subbarao N, Puri N, Tyagi RK. Transcription regulation of nuclear receptor PXR: Role of SUMO-1 modification and NDSM in receptor function. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015.
194. Guo B, Sharrocks AD. Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(11):3204-18.
195. Hilgarth RS, Murphy LA, O'Connor CM, Clark JA, Park-Sarge OK, Sarge KD. Identification of *Xenopus* heat shock transcription factor-2: conserved role of sumoylation in regulating deoxyribonucleic acid-binding activity of heat shock transcription factor-2 proteins. *Cell stress & chaperones*. 2004;9(2):214-20.
196. Guo Z, Kanjanapangka J, Liu N, Liu S, Liu C, Wu Z, et al. Sequential posttranslational modifications program FEN1 degradation during cell-cycle progression. *Molecular cell*. 2012;47(3):444-56.
197. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development*. 2000;14(19):2501-14.
198. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*. 1989;49(17):4682-9.
199. Lin X, Liang M, Liang YY, Brunnicardi FC, Feng XH. SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(33):31043-8.
200. Tracy MR, Hedges SB. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene*. 2000;259(1-2):129-38.
201. Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, Lopez-Aleman R. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:156795.
202. Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(7):902-20.
203. Martorell L, Gentile M, Rius J, Rodriguez C, Crespo J, Badimon L, et al. The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(21):5828-42.