HAL
open science

Etude de 2 gènes cibles de la protéine P53 : siah (seven in absentia human homologue) et tsap6 (tumor suppressor activated pathway 6)

Séverine Beaucourt

To cite this version:

Séverine Beaucourt. Etude de 2 gènes cibles de la protéine P53 : siah (seven in absentia human homologue) et tsap6 (tumor suppressor activated pathway 6). Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT : . tel-00157749

HAL Id: tel-00157749

https://theses.hal.science/tel-00157749v1

Submitted on 27 Jun 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université PARIS XI
Faculté de Médecine Paris Sud

Année 2005

N° attribué par la bibliothèque

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Spécialité CANCÉROLOGIE

présentée et soutenue publiquement
par

Séverine BEAUCOURT

le 25 Octobre 2005

Etude de 2 gènes cibles de la protéine P53 : *siah* (*seven in absentia human homologue*) et *tsap6* (*tumor suppressor activated pathway 6*)

Directeur de thèse : Pr Adam TELERMAN

Jury composé de :

Pr Bruno GOUD	Rapporteur
Dr Pierre HAINAUT	Rapporteur
Pr François DAUTRY	Examinateur
Pr Jean CAVARELLI	Examinateur

"I am satisfied with the mystery of life's eternity and with the awareness of--and glimpse into--the marvelous construction of the existing world together with the steadfast determination to comprehend a portion, be it ever so tiny, of the reason that manifests itself in nature. This is the basis of cosmic religiosity, and it appears to me that the most important function of art and science is to awaken this feeling among the receptive and keep it alive."

Albert Einstein

Avant-propos

Je souhaiterais avant toute chose remercier Adam Telerman et Robert Amson pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années, et surtout à mon arrivée au laboratoire lorsque je cherchais un stage qui devait marquer la "fin de mes études". C'est grâce à leurs encouragements et à ceux de toute l'équipe que j'ai entrepris de faire cette thèse. Merci de m'avoir permis de travailler sur ce fascinant projet qu'est la réversion tumorale.

Je voudrais remercier Bruno Goud et Pierre Hainaut pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également aux autres membres du jury, François Dautry et Jean Cavarelli, d'avoir accepté de participer à ma soutenance.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la coopération et le soutien de tout le laboratoire.

Merci tout d'abord à Giusy qui a dirigé la majorité des travaux que j'ai réalisé durant ces 4 années de doctorat. Merci également à Marcel aux côtés duquel j'ai pu travailler à mes débuts chez MEL.

Merci à Alexandra, Dominique, Anne, Pamela et Nathalie qui ont toutes contribué activement aux résultats présentés ici ; mais surtout avec qui j'ai pu travailler au quotidien dans la bonne humeur, la confiance et le respect.

Merci à Vanessa et Christophe pour leur soutien, leurs nombreux conseils techniques et stratégiques tant au cours de la réalisation que de la rédaction de ces expériences.

Merci à Virginie pour ses encouragements constants.
Merci à Sylvie pour m'avoir accordé sa confiance dès le jour où j'ai passé la porte du laboratoire et pour m'avoir appris beaucoup lors de mes premiers mois chez MEL.
Je n'oublie pas de remercier Laurent et Stéphanie ainsi que les personnes qui ont auparavant travaillé sur ce projet de réversion tumorale qui nous tient tous tant à cœur.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont contribué à l'avancée de ces travaux ; en particulier Moshe Oren et Bohdan Wasylyk pour leurs conseils, leur confiance et leur aide technique.
Mes remerciements vont également à Pierre Chambon et son équipe, Michel Vidal, Shu-Ren Wang, Valérie Goutty et Astrid Rey pour leur aide concernant les souris. Je voudrais aussi adresser mes remerciements à Johannes Grosse et ses collègues de la société Ingenium pour nous avoir fourni les souris TSAP6 mutantes.

Je n'oublie pas que c'est grâce à certains de mes professeurs que j'ai acquis des méthodes de travail, et que j'ai découvert et aimé la science et surtout la biologie.

Je voudrais aussi remercier les amis qui m'ont apporté leur soutien, leur amitié et leur joie de vivre. Ils se reconnaitront.

Un grand merci à mes parents, mes grands parents, à Stéfanie et à Rémi pour m'avoir entouré, conseillé et encouragé depuis toujours.

Enfin et surtout, MERCI à Méryl pour tant de choses, et en particulier pour avoir concédé que je le fasse parfois passer après mon travail durant ces quatre ans.

Résumé en français

Notre travail a consisté à étudier 2 gènes impliqués dans la réversion tumorale et régulés par P53.

Nous avons identifié dans le promoteur du gène *siah-1b* une séquence sur laquelle P53 se lie *in vitro* et *in vivo*. De plus, nous avons montré la fonctionnalité de cet élément de réponse suite à l'induction de P53.

La particularité de ce site, dont la structure diffère fortement du consensus de liaison de P53 à l'ADN, ouvre de nouvelles perspectives dans l'analyse des mécanismes régulés par P53.

L'étude de la protéine TSAP6 murine a permis de caractériser son expression au niveau tissulaire et intracellulaire. La fonction de TSAP6 n'étant pas bien connue, nous avons entrepris de l'analyser dans des modèles animaux portant un gène *tsap6* muté ou invalidé.

La mutation du gène *tsap6* Gln-395-Lys induit l'apparition d'une microcytose et d'un emphysème pulmonaire chez la souris. La caractérisation des mécanismes conduisant à ces phénotypes est en cours et nous permettra de mieux comprendre la fonction de TSAP6.

Mots clés : P53, cancer, suppression tumorale, réversion tumorale, Siah, TSAP6

English summary

We studied 2 genes involved in tumor reversion and regulated by P53 : *siah-1* and *tsap6*.

We have identified, in the promoter of the *siah-1b* gene, a sequence which binds P53 *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, we showed that this sequence is a functional P53 response element that can under induction of P53 lead to activation of this promoter.

This P53 binding site presents a non-classical structure compared to the consensus described for P53 binding. This could lead to new prospects in the analysis of P53-regulated mechanisms.

We have characterized the tissular and cellular expression of the murine TSAP6. Since TSAP6 function is poorly understood, we started to depict it in animal models bearing a *tsap6* gene mutated or deleted.

The mutation Gln-395-Lys in the TSAP6 protein triggers microcytosis and pulmonary emphysema in mouse. The characterization of the mechanisms promoting these phenotypes is in progress and will help us to better understand TSAP6 function.

Key words : P53, cancer, tumor suppression, tumor reversion, Siah, TSAP6

Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Cancérologie de l'Université PARIS XI

Laboratoire d'accueil
Molecular Engines Laboratories (aujourd'hui devenu Cerenis)
20 rue bouvier
75011 PARIS

Table des matières

Table des matières ***1***

Table des illustrations ***4***

Table des annexes ***5***

Résumé ***6***

Abréviations ***7***

Nomenclature ***7***

Introduction ***8***

I - Suppression et réversion tumorale 11
I.1 - Bref historique sur la suppression tumorale 11
I.2 - La réversion tumorale 13

II - P53 18
II.1 - La découverte de P53 18
***II.2 - p53* : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ? 18**
II.2.1 - p53 serait un oncogène ? 18
II.2.2 - p53 : un gène suppresseur de tumeur 19
II.3 - P53 et le cycle cellulaire 19
II.4 - P53 et le cancer 20
II.5 - P53 est un facteur de transcription 21
II.5.1 - La découverte de l'activité de facteur de transcription 21
II.5.2 - Le site consensus de liaison de P53 sur l'ADN 21
II.5.3 - Un facteur de transcription sous forme tétramérique 21
II.5.4 - Les gènes de réponse à P53 22
II.5.4.1 - Généralités 22
II.5.4.2 - Le gène p21/waf1/cip1 23
II.5.4.3 - Les gènes tsip et tsap 23
II.6 - Les activités de P53 indépendantes de la transcription 24
II.6.1 - La régulation de l'activité d'autres protéines 24
II.6.2 - La réparation de l'ADN 24
II.6.3 - Les autres fonctions de P53 24
II.7 - La régulation de P53 25
II.7.1 - La régulation au niveau transcriptionnel 25
II.7.2 - La régulation au niveau traductionnel 25
II.7.3 - La régulation au niveau post-traductionnel 25
II.7.3.1 - La phosphorylation de P53 26
II.7.3.2 - L'acétylation de P53 26
II.7.3.3 - La méthylation de P53 26
II.7.3.4 - L'ubiquitination de P53 26
II.7.3.4.1 - La poly-ubiquitination et la dégradation de P53 par le protéasome 26
II.7.3.4.2 - La mono-ubiquitination de P53 27
II.7.3.5 - Les autres modifications de P53 27
II.7.4 - La régulation par la boucle Mdm2 : une balance subtile 27
II.7.5 - La régulation de la fonction de P53 28
II.7.5.1 - Les conditions de l'activation de P53 28
II.7.5.2 - La balance apoptose/arrêt de croissance 29
II.8 - Une activité anti-apoptotique paradoxale de P53 30
II.9 - Les dernières découvertes liées à P53 30

III - Introduction aux gènes *siah* 33
III.1 - Une famille de gènes fortement conservés 33
III.1.1 - Le membre fondateur : le gène *sina* de drosophile 33
III.1.2 - Les homologues chez les mammifères 34
III.1.2.1 - Les gènes siah-1 34
III.1.2.1.1 - Siah-1 chez la souris 34
III.1.2.1.2 - Siah-1 chez l'humain 35

III.1.2.2 - Le gène siah-2 35
III.2 - Structure des protéines de la famille Siah 37
III.2.1 - Structure générale 37
III.2.2 - Un domaine RING 37
III.2.3 - Un domaine de liaison au substrat 37
III.2.4 - Un domaine d'oligomérisation 38
III.2.5 - Un domaine de localisation nucléaire 39
III.2.6 - Un domaine putatif de liaison à l'ARN 39
III.3 - Les protéines de la famille Siah sont des E3 ligases 39
III.3.1 - La voie de l'ubiquitination 39
III.3.2 - Les E3 ligases 40
III.3.3 - Les fonctions de l'ubiquitination 41
III.3.4 - Siah et la dégradation par la voie du protéasome 41
III.4 - La régulation de l'expression de Siah 42
III.4.1 - La régulation transcriptionnelle 42
III.4.1.1 - Généralités 42
III.4.1.2 - Une régulation par épissage alternatif ? 43
III.4.1.2.1 - Chez l'humain 43
III.4.1.2.2 - Chez la souris 43
.III.4.1.2.2.1 Des résultats difficilement interprétables 43
.III.4.1.2.2.2 Un début d'explication 44
III.4.2 - La régulation post-transcriptionnelle 45
III.4.2.1 - Au niveau ARNm 45
III.4.2.2 - La dégradation de la protéine 45
III.4.3 - Une expression différentielle 46
III.4.3.1 - Localisation intracellulaire 46
III.4.3.2 - Distribution tissulaire 46
III.4.3.2.1 - Siah-1 46
III.4.3.2.2 - Siah-2 47
III.4.3.3 - Une expression modifiée biologiquement 47
III.4.3.4 - Une expression modifiée chimiquement 48
III.5 - Au niveau de l'organisme : implication des protéines Siah dans le développement 49
III.5.1 - Rôle majeur des protéines Siah dans l'embryogénèse 49
III.5.2 - Effet de Siah-1a sur la croissance 49
III.5.3 - Implication dans le développement neuronal 50
III.5.3.1 - La formation des yeux 50
III.5.3.2 - Les récepteurs à la Nétrine 50
III.5.4 - Implication dans la formation des os 50
III.5.5 - Implication dans l'hématopoïèse 51
III.5.6 - Une activité au niveau des organes sexuels 51
III.6 - Au niveau cellulaire : le rôle de Siah dans la prolifération et l'apoptose 52
III.6.1 - Siah et le cycle cellulaire 52
III.6.1.1 - Généralités 52
III.6.1.2 - La mitose 52
III.6.1.2.1 - La protéine Kid 53
III.6.1.2.2 - La protéine Bag-1 (Bcl-2-associated athanogene) 53
III.6.1.2.3 - La protéine Siah-BPI (Siah Binding Protein I) 54
III.6.1.3 - La méïose 54
III.6.2 - Siah et l'apoptose 55
III.6.2.1 - Généralités 55
III.6.2.2 - La β-caténine 56
III.6.2.3 - La protéine Pw1/Peg3 57
III.6.2.4 - La protéine TRAF2 57
III.6.2.5 - La GAPDH 57
III.6.2.6 - Autres implications de Siah dans l'apoptose 57
III.6.3 - Autres fonctions cellulaires de Siah 58
III.7 - Les pathologies associées à Siah 61
III.7.1 - La maladie de Parkinson 61
III.7.2 - Le syndrome de Usher 61
III.7.3 - L' infection bactérienne 61
III.7.4 - Le locus *siah-1b* 61
III.7.5 - Le phénotype *tottering* 61
III.7.6 - L'oligosyndactylie 62
III.7.7 - Les phénotypes localisés proches des gènes *siah* 62
III.7.8 - Les cancers 62

III.7.8.1 - Les carcinomes 62
III.7.8.2 - Les cancers gastriques 63
III.7.8.3 - Les lymphomes 63
III.7.8.4 - Les cancers du sein et du colon 63
***III.8 - siah-1* est un gène majeur de la réversion tumorale 64**
III.8.1 - siah-1 est surexprimé dans les cellules révertantes 64
III.8.2 - Siah-1 joue un rôle actif dans la réversion tumorale 64

IV - Siah-1b est un effecteur de P53 66
IV.1 - Les corrélations entre l'expression de Siah et P53 66
IV.2 - L'activité cellulaire de P53 *via* Siah 67
IV.3 - La controverse 67
IV.4 - Le gène *siah-1b* est directement régulé par P53 68

Article 1 69
IV.5 - Perspectives : Génération de souris KO pour *siah-1b* 70

V - Introduction à la protéine TSAP6 74
V.1 - Les protéines de la famille STEAP 74
V.1.1 - Brève description de TSAP6 75
V.2 - Les homologues de TSAP6 76
V.2.1.1 - La protéine STEAP (Six Transmembrane Epithelial Antigene of the Prostate) 76
V.2.1.2 - La protéine STEAP-2 = STAMP1 (Six TrAnsMembrane protein of Prostate 1) 77
V.2.1.3 - La protéine TIARP (TNFα Induced Adipose Related Protein) 77
V.3 - La régulation de l'expression de TSAP6 par P53 78
V.4 - TSAP6 dans la réversion tumorale 79
V.5 - TSAP6 et l'apoptose 80
V.6 - TSAP6 et le cycle cellulaire 80
V.7 - TSAP6 et la sécrétion 81

VI - Caractérisation de la protéine mTSAP6 82
VI.1 - Caractérisation biochimique de la protéine 82
VI.1.1 - TSAP6 est une protéine glycosylée in vivo 82
VI.1.2 - TSAP6 est une protéine à demi-vie courte 83
VI.1.3 - TSAP6 peut s'homodimériser 83
VI.1.4 - TSAP6 et l'hémine 84
VI.2 - Localisation de TSAP6 au niveau tissulaire 86

VII - Etude de la fonction de la protéine mTSAP6 90
VII.1 - Des souris mutantes pour *tsap6* présentent des anomalies pulmonaires et sanguines 90
VII.1.1 - Génération des souris mutantes 90
VII.1.2 - Analyse des phénotypes des souris TSAP6 mutantes Gln-395-Lys 91
VII.1.3 - Les anomalies sanguines dans les souris mutantes 91
VII.1.3.1 - Quelques notions sur microcytose et érythrocytose 91
VII.1.3.2 - Analyse des anomalies sanguines dans les souris mutantes 92
VII.1.4 - L'emphysème dans les souris mutantes 93
VII.1.4.1 - Quelques notions sur l'emphysème 93
VII.1.4.2 - Analyse du phénotype pulmonaire des souris mutantes 95
VII.1.5 - Perspectives 98
VII.1.5.1 - Une piste pour expliquer le phénotype sanguin 98
VII.1.5.2 - Plusieurs pistes pour expliquer l'emphysème pulmonaire 98
VII.1.5.3 - Corrélations entre les phénotypes 98
VII.2 - Génération de souris KO pour *tsap6* 102
VII.2.1 - Le KO *tsap6* 102
VII.2.2 - La construction 102

Discussion ***104***

Bibliographie ***109***

Annexes ***128***

Table des illustrations

Figure 1 : Historique de la réversion tumorale 13
Figure 2 : Effet du parvovirus H1 sur les cellules 14
Figure 3 : Technique d'isolement des cellules révertantes à l'aide du parvovirus-H1 15
Figure 4 : Structure de la protéine P53 22
Figure 5 : La boucle P53/Mdm2 28
Figure 6 : La balance apoptose/arrêt de croissance 29
Figure 7 : Représentation d'une ommatidie d'oeil de drosophile 33
Figure 8 : Voie d'activation conduisant au développement du photorécepteur R7 34
Figure 9 : Structure des protéines Siah 37
Figure 10 : Séquence consensuelle des protéines interagissant avec Siah 38
Figure 11 : La réaction d'ubiquitination 40
Figure 12 : Le promoteur du gène hsiah-1 43
Figure 13 : Expression de siah-1 *dans les cellules intestinales en apoptose à l'extrémité des villi* 55
Figure 14 : Les voies d'activation de la β-caténine 56
Figure 15 : Réorganisation des cellules tumorales cultivées en 3D suite à la surexpression de Siah-1 64
Figure 16 : Construction pour le KO siah-1b 71
Figure 17 : Le système de recombinaison CRE-lox 71
Figure 18 : Structure prédite de la protéine TSAP6 à la membrane plasmique dans l'hypothèse de 6 domaines transmembranaires 74
Figure 19 : Northern blot *montrant que l'expression de* tsap6 *est régulée par P53* 78
Figure 20 : Activité luciférase montrant la régulation du promoteur tsap6 *par P53* 78
Figure 21 : Northern blot montrant l'expression de tsap6 *dans les cellules révertantes* 79
Figure 22 : Caractérisation de TSAP6 par Western blot 82
Figure 23 : Détermination de la demi-vie de la protéine TSAP6 par pulse chase 83
Figure 24 : TSAP6 forme des oligomères 84
Figure 25 : Alignement de différents protéines présentant un domaine ACRATA 85
Figure 26 : En présence d'hémine, les cellules contiennent des formes de TSAP6 de haut poids moléculaire 85
Figure 27 : Etude de l'expression de TSAP6 par Western blot *sur des organes de souris* 86
Figure 28 : Analyse immunohistochimique de la localisation de TSAP6 dans différents organes 88
Figure 29 : La mutation Gln-395-Lys dans le gène tsap6 90
Figure 30 : Les souris mutantes présentent de la microcytose et de l'érythrocytose 92
Figure 31 : Analyse de la taille des réticulocytes et érythrocytes par cytométrie de flux 93
Figure 32 : Histopathologie montrant un net emphysème pulmonaire dans les souris tsap6 *mutantes* 95

Figure 33 : Analyse par Western blot de l'expression de TSAP6 dans les poumons 96
Figure 34 : Analyse par Western blot de l'expression de TSAP6 dans le foie 96
Figure 35 : TSAP6 et ses partenaires 101
Figure 36 : Structure du gène tsap6 102
Figure 37 : Construction pour le KO tsap6 103
Figure 38 : Hypothèse d'un repliement de l'ADN pour la liaison de P53 au promoteur de siah-1b 106

Tableau 1: La conservation des gènes siah 36
Tableau 2 : Les interactants des protéines Siah 60
Tableau 3 : TSAP6 et ses homologues 76

Table des annexes

Annexe 1 : Quelques liens sur P53 129
Annexe 2: Quelques liens sur Siah 130
Annexe 3 : Quelques liens sur TSAP6 131
Annexe 4 : Lexique 132

Résumé

L'objectif de notre équipe est de caractériser de nouvelles cibles pour la thérapie antitumorale. Une première approche a permis d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée suite à l'activation de la protéine P53. Une seconde approche a mis en évidence les gènes régulés lors de la réversion tumorale. Par ces deux méthodes, nous avons identifié de nombreux gènes d'intérêt parmi lesquels nous avons choisi d'étudier *siah-1* et *tsap6*.

Nous avons mis en évidence la présence et la fonctionnalité d'un élément de réponse à P53 dans le promoteur du gène *siah-1b*. Le promoteur de *siah-1b* comporte en effet une séquence sur laquelle P53 se lie *in vitro* comme *in vivo*. De plus, l'induction de P53 dans les cellules entraîne l'activation transcriptionnelle de cette zone promotrice.

La particularité de ce site, dont la structure diffère fortement du consensus de liaison de P53 à l'ADN, ouvre de nouvelles perspectives dans l'analyse des mécanismes régulés par P53.

L'étude de la protéine TSAP6 chez la souris a permis de caractériser son expression au niveau tissulaire et intracellulaire. Cette protéine membranaire à demi-vie courte peut être glycosylée et semble induite par l'hémine. La fonction de TSAP6 n'étant pas bien connue, nous avons entrepris de l'analyser dans des modèles animaux portant un gène *tsap6* muté ou une invalidé.

La mutation du gène *tsap6* sur le codon Gln-395 induit chez la souris l'apparition d'un emphysème pulmonaire et d'une microcytose couplée à une érythrocytose. La caractérisation des mécanismes conduisant à ces phénotypes nous permettra de mieux comprendre la fonction de TSAP6.

Nos travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant la fonction de ces protéines, ainsi que de caractériser certains aspects de leur régulation. Les mécanismes d'action de Siah et TSAP6 pourront être approfondis par l'étude des souris KO pour chacun de ces gènes. Ces nouvelles informations sur des protéines de la voie P53 pourraient apporter des éléments intéressants pour le développement de thérapies antitumorales.

Abréviations

ADN	Acide Desoxyribo Nucléique	
ADNc	ADN complémentaire	
APC	*Anaphase Promoting Complex*	
ARN	Acide Ribo Nucléique	
ARNm	ARN messager	
ATP	Adenosine Tri Phosphate	
cM	centiMorgan	unité de mesure de l'ADN
coll.	collaborateurs	
EGF	*Epidermal Growth Factor*	
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*	Technique de dosage protéique
IL	InterLeukine	
kb	kilo bases	
kDa	kilo Dalton	unité de mesure des protéines
KO	*knock-out*	
mdm2	*mouse double minute 2*	gène régulé par P53
MEFs	*Mouse Embryo Fibroblasts*	Cellules embryonnaires de souris
MEL	*Mouse Erythro Leukemia*	Cellules leucémiques de souris
pb	paires de bases	unité de mesure de l'ADN
pBS	pBluescript	type de vecteur
PCR	*Polymerase chain Reaction*	réaction d'amplification de l'ADN
RING	*Really Interesting New Gene*	
SBD	*Substrat Binding Domain*	
siah	*Seven In Absentia Homologue*	
SiahBPI	*Siah Binding Protein I*	
sina	*seven in absentia*	
SIP	*Siah Interacting Protein*	
TBP	*TATA Binding Protein*	
TCTP	*Translationnaly Controlled Tumor Protein*	
tsap	*Tumor Suppressor Activated Pathway*	Gène réprimé lors du phénomène de suppression tumorale
tsip	*Tumor Suppressor Inhibited Pathway*	Gène activé lors du phénomène de suppression tumorale
WT	*Wild Type*	Se dit d'un phénotype sauvage

Nomenclature

Les noms des gènes et des ARNm qu'ils codent sont écrits en minuscules et en italique.

Les noms des protéines commencent par une majuscule.La lettre placée devant le nom d'un gène ou d'une protéine indique l'espèce considérée : h : humaine , m : murine , r : rat , x : xénope

Introduction

Contrairement à la plupart des autres maladies, le cancer est aujourd'hui un fléau planétaire qui touche toutes les classes de la population, et l'on ne connaît pas de véritable moyen de prévenir son apparition. Ainsi, sur les 56 millions de décès enregistrés dans le monde en 2000, près de 12% étaient dus à un cancer. Selon les estimations de l'OMS, le nombre de nouveaux cas de cancers devrait atteindre 15 millions en 2020, alors qu'il était de 10 millions en 2000.

Certains traitements curatifs ont été mis au point mais ils ne sont pas adaptés à la grande variabilité des cancers, et leur manque de spécificité cellulaire peut générer de nombreux effets secondaires. De plus leur efficacité reste très variable selon les individus. C'est pourquoi de nombreuses études sont menées pour tenter de trouver de nouvelles thérapies. Elles sont généralement basées sur la compréhension des mécanismes qui conduisent une cellule normale à devenir cancéreuse.

L'équipe d'Adam Telerman et Robert Amson, dont je fais partie, a choisi d'adopter une stratégie différente et innovante basée sur l'observation selon laquelle certaines cellules cancéreuses parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué, c’est ce que l’on appelle **la réversion tumorale**. Les études menées visent donc à comprendre les mécanismes qui conduisent certaines cellules cancéreuses à perdre quelques unes de leurs caractéristiques tumorales pour identifier des protéines clés impliquées dans ce processus. Certaines de ces protéines peuvent s'avérer être de nouvelles cibles de thérapie anticancéreuse.

Toutefois, ce phénomène étant extrêmement rare, il a fallu pour pouvoir l'étudier, élaborer une technique permettant d’isoler spécifiquement ces cellules, dites **révertantes.** C'est pourquoi notre équipe a mis au point, une technique permettant de sélectionner ces cellules. Cette technique a mis à profit la particularité qu'a le parvovirus H1 de tuer préférentiellement les cellules transformées tout en épargnant les cellules normales. Une fois les cellules sélectionnées, il faut les isoler et les amplifier afin d'en dériver des modèles cellulaires (Telerman et al., 1993).

Pour appréhender ces mécanismes, l’équipe a choisit d’étudier les différences d’expression des ARNm et des protéines entre les cellules tumorales et leurs sœurs isogéniques révertantes afin de caractériser de nouveaux gènes suppresseurs de tumeur ou inducteurs de la réversion tumorale (Roperch et al., 1999; Tuynder et al., 2002). Parmi eux

nous avons retrouvé des gènes (*siah-1*, *tsap6*, …) dont notre équipe avait déjà montré qu'ils étaient régulés par la protéine d'intérêt majeur dans le cancer : P53 (Amson et al., 1996).

Dans les tumeurs humaines, le gène le plus souvent observé comme étant muté est celui codant pour la protéine P53 (muté dans plus de 50% des cancers). La surexpression du gène *p53* sauvage dans des cellules induit leur arrêt de croissance et/ou l'apoptose. De plus, l'inactivation du gène *p53* dans des souris par des techniques de *knock-out*, entraîne l'apparition d'un nombre anormalement élevé de tumeurs (Donehower et al., 1992).

Dans le domaine de la thérapie anticancéreuse, de grands espoirs ont été fondés sur la compréhension des mécanismes de régulation de P53 et de son action. D'innombrables études ont ainsi été menées, en utilisant différentes approches, dans le but de caractériser les régulateurs et les effecteurs de P53.

Mon travail a consisté à étudier deux protéines à la fois effectrices de P53 et impliquées dans la réversion tumorale : les protéines Siah et TSAP6. J'ai pu appréhender certains de leurs modes de régulation et établir une partie de leurs fonctions respectives.

Suppression et réversion tumorale

I - Suppression et réversion tumorale

Les causes de l'apparition des tumeurs ont longtemps été mal connues. Même si Boveri avait très tôt émis l'hypothèse qu'elles pouvaient être dues à des problèmes génétiques (Boveri, 1914). On savait également que dans certains cas elles pouvaient être héréditaires.

L'analyse mathématique faite par Knudson à partir de différentes données cliniques de patients atteints de rétinoblastome lui a permis d'établir le dogme du développement du cancer : il faut deux événements mutationnels ("the two hits hypothesis") (Knudson, 1971). Cette théorie était annonciatrice de la découverte des gènes suppresseurs de tumeur.

I.1 - Bref historique sur la suppression tumorale

Pour revue voir (Knudson, 2001)

L'existence de la suppression tumorale a été montrée par Harris et Miller (Harris et al., 1969) lors d'expériences de fusion entre des cellules malignes et des cellules normales. Ces cellules de fusion se sont avérées très peu tumorigènes lors d'injection en souris, contrairement à ce qui était observé pour les cellules parentales malignes. Ils ont suggéré que l'apport chromosomique des cellules normales permettait la suppression du phénotype malin dans les hybrides.

En 1976, Stehelin, Varmus, Bishop et Vogt (Stehelin et al., 1976) démontrèrent, qu'un virus peut devenir tumorigène après avoir inséré dans son propre génome un gène appartenant à la cellule qu'il a préalablement infectée. Ce gène cellulaire, indispensable à la tumorisation induite par le virus, a été qualifié d'**oncogène**. L'importance de cette découverte leur a permis de recevoir le prix Nobel.

Les **proto-oncogènes** sont des gènes dont le rôle normal est de favoriser la division cellulaire. Lorsqu'ils subissent certaines mutations, ils deviennent des **oncogènes** qui produisent une protéine en plus grande quantité et/ou hyper-active (mutation "gain de fonction"), ce qui entraîne une prolifération anarchique des cellules.

Les **gènes suppresseurs** de tumeurs sont au contraire :

✓ des molécules de surveillance de l'intégrité de la cellule qui sont chargées de détecter les anomalies de la cellule (mutation, lésion, changements de l'environnement…)

✓ des freins du cycle cellulaire qui sont activés en cas de défaut détecté dans la cellule. A l'état activé, ils peuvent être stabilisés, transloqués dans le noyau où ils bloquent la division cellulaire. Cette pause permet à la cellule de réparer ses éventuelles anomalies ou d'attendre que son environnement redevienne normal.

✓ des molécules induisant la mort cellulaire programmée des cellules : l'apoptose.

Lorsqu'ils sont mutés, les gènes suppresseurs perdent leur activité (mutation "perte de fonction"). S'ils ne sont pas réparés, il n'y a plus de frein à la prolifération, ce qui entraîne une croissance anarchique.

La notion de gène suppresseur a rejoint l'hypothèse de Knudson : 2 mutations récessives sur un gène suppresseur de tumeurs favorisent la dérégulation de la cellule et par la suite l'apparition du cancer (portant de plus en plus d'anomalies). Le tout a été validé par la

caractérisation du premier gène suppresseur de tumeur : *rb1*, le gène impliqué dans le développement du rétinoblastome.

En 1987, des expériences ont montré que l'introduction d'un chromosome particulier dans certaines cellules tumorales (tumeur de Wilm's) peut induire leur suppression tumorale (Weissman et al., 1987). Tout comme dans les expériences de Harris et Miller, il y avait complémentation de la cellule maligne par apport de matériel génétique exogène.

L'équipe de Cavenee (James et al., 1988) a permis d'établir que si un des allèles d'un gène porte une mutation récessive (hétérozygotie de cet allèle) , il suffit d'une seule mutation sur l'autre allèle (mutation ponctuelle, délétion, recombinaison, …) pour que la fonction de ce gène soit perdue. C'est la découverte de la notion de perte d'hétérozygotie.

Si ce gène est un suppresseur de tumeur, cette perte d'hétérozygotie peut faire passer une cellule normale à l'état tumoral. Cette découverte rejoint l'hypothèse "two steps" de Knudson.

La notion de suppression tumorale correspond donc à la complémentation d'un manque présent dans les cellules tumorales par un apport externe d'information génétique.

I.2 - La réversion tumorale

Il a été montré que certaines cellules tumorales parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué. Ce phénomène est appelé **la réversion tumorale**.

1968 - Pollack, Green, Todaro. PNAS **1968 - Rabinowitz and Sachs. Nature**	cellules NIH3T3	infection par virus polyoma ou SV40	*Flat revertants*
1984 - Salmon, Zwiebel. J.Cellular Physiol.	cellules NIH3T3	infection par le virus du sarcome de Kirsten	*Flat revertants*
1983 - Noda. PNAS **1989 - Kitayama. Cell**	cellules NIH3T3	découverte de K-Rev1	
1989 - Degos Lancet		traitement à l'acide rétinoique	Différenciation terminale
1993 - Telerman et *al. PNAS*	cellules leucémiques humaines K562	tuées par le parvovirus H1	Cellules révertantes KS
1996 - Nemani et *al. PNAS*	cellules leucémiques humaines U937 et K562	tuées par le parvovirus H1 découverte du rôle de Siah	Cellules révertantes US et KS
1997 - Bissel JCB		Effet de l'environnement sur les cellules tumorales	
2002 - Tuynder et *al. PNAS*	cellules de cancer du sein	tuées par le parvovirus H1 découverte du rôle de TCTP	Cellules révertantes
2004 - Tuynder et *al. PNAS*	cellules de cancer du colon, poumon et mélanome	tuées par le parvovirus H1	Cellules révertantes
	cellules NIH3T3 et NIH3T3 v-src	transfectées anti-sens TCTP	Réversion

Figure 1 : Historique de la réversion tumorale

Les cellules normales présentent un certain nombre de caractéristiques qui les différencient des cellules tumorales : elles sont notamment sensibles à l'inhibition de contact. L'infection de cellules normales de souris NIH3T3 par le virus SV40 rend celles ci insensibles à l'inhibition de contact et plus tumorigènes. Elles se rapprochent donc de cellules tumorales ; c'est pourquoi ce modèle a largement été étudié pour comprendre le processus de cancérisation.

La découverte, dans ces cellules infectées, de sous-clones redevenus sensibles à la densité cellulaire (Pollack et al., 1968) a ouvert la voie de la réversion tumorale, puisque ces clones retrouvaient "spontanément" des caractéristiques de croissance de cellules normales et surtout étaient beaucoup moins tumorigènes. Ces sous-clones ont été qualifiés de révertants plats "flat revertants" en raison de leur morphologie.

Les cellules **révertantes** sont donc des cellules filles isogéniques mais phénotypiquement différentes, moins tumorigènes que leurs cellules parentales tumorales.

Ces expériences ont été validées par la répétition de ce phénomène avec d'autres virus ou agents inducteurs et d'autres types cellulaires (pour revue voir (Ozer and Jha, 1977)).

Il a également été montré par des expériences de fusion que le phénotype révertant peut être dominant sur le phénotype mutateur (Noda et al., 1983).

La réversion de cellules transformées a également été obtenue suite à leur transfection avec des banques d'ADNc (Noda and Ikawa, 1986; Noda et al., 1989). L'analyse des différents clones révertants résultant de cette transfection a montré qu'ils ont chacun incorporé une dizaine d'ADNc différents. La transfection de cellules tumorales avec chacun de ces ADNc, a conduit à la découverte de gènes pouvant induire ce phénotype suppresseur de façon indépendante les uns des autres. Parmi eux : *k-rev1* (Kitayama et al., 1989) dont le niveau d'expression, dans les cellules où il est transfecté, corrèle avec la suppression du phénotype transformé.

L'effet de l'environnement sur le caractère transformé des cellules a également été suggéré suite à l'induction de la réversion tumorale de cellules cultivées en matrice tridimensionnelle en présence d'anticorps bloquant la β1-intégrine (Weaver et al., 1997).

Notre équipe a, quant à elle, mis au point une technique d'isolement de cellules révertantes (Telerman et al., 1993) basée sur la particularité du parvovirus à tuer préférentiellement les cellules transformées tout en épargnant les cellules "normales".

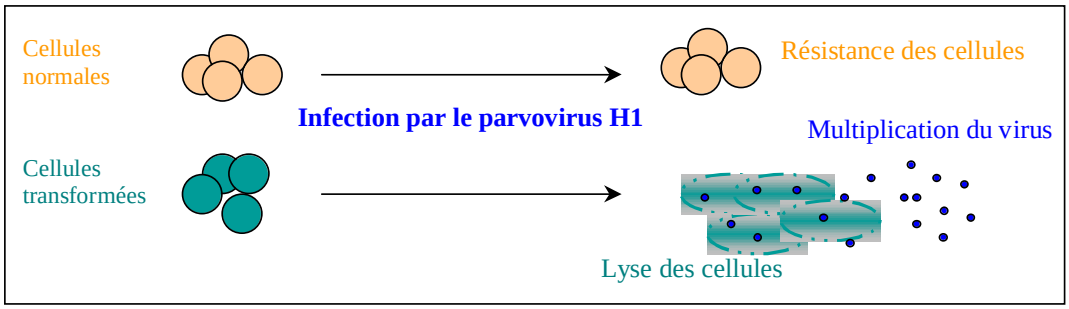


Figure 2 : Effet du parvovirus H1 sur les cellules

En infectant des cellules tumorales avec ce virus la très grande majorité d'entre elles meurent peu à peu. Mais après quelques semaines de maintient en culture, on peut observer l'émergence de clones résistant à l'effet cytotoxique du virus (environ 1/1 000 000). Ce sont donc potentiellement des cellules qui ont un phénotype tumoral atténué : des cellules révertantes.

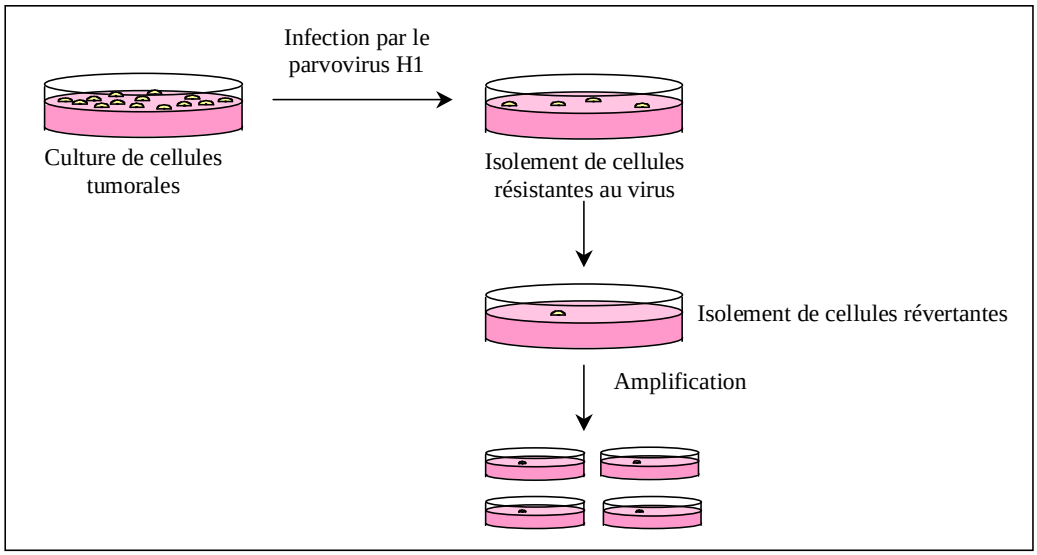


Figure 3 : Technique d'isolement des cellules révertantes à l'aide du parvovirus-H1

Ces cellules révertantes ont des caractéristiques proches des cellules normales :

- elles résistent au parvovirus si on les ré-infecte
- elles ne poussent plus en agar mou, ce qui indique qu'elles ont perdu leur caractéristique tumorale de croissance en indépendance d'ancrage
- elles sont beaucoup moins tumorigènes que les cellules tumorales lors d'injection en souris

Cette réversion ne s'apparente pas à de la différenciation puisque

- l'analyse de certains marqueurs de différenciation n'a pas révélé de distinction d'expression entre les cellules parentales et révertantes
- la morphologie des cellules révertantes ne diffère pas de celle des cellules parentales

Nous pensons que la réversion pré-existe à l'infection par le parvovirus qui n'est utilisé que pour sélectionner les cellules révertantes (Tuynder et al., 2004). Mais, dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas exclure que le parvovirus aide à l'apparition de cellules révertantes.

Le parvovirus n'est, en tout cas, pas nécessaire au maintient du phénotype révertant. En effet, certains clones ne produisent plus de parvovirus (pas de production de particule virale), ne contiennent pas d'ADN viral et conservent leur phénotype révertant (Tuynder et al., 2002).

L'étude des ARNm dans ces lignées révertantes et les lignées tumorales dont elles sont issues (dites parentales) nous a permis de mettre en évidence par *cDNA differential display* des différences d'expression (Nemani et al., 1996; Roperch et al., 1999; Tuynder et al., 2002). Ces différences ont été confirmées par *Northern blot* avec des sondes spécifiques et parfois au niveau protéique par *Western blot*.

Nous avons trouvé, entre autres deux gènes, surexprimés dans les cellules révertantes et que nous avions déjà identifiées comme importants dans le mécanisme de suppression tumorale, puisqu'ils avaient été trouvés régulés positivement par P53. Il s'agit des gènes* siah-1 *et* tsap6. *Ce sont ces deux gènes que nous avons étudié ici.

P53

II - P53

La majorité des informations présentées sur P53 sont regroupées dans la revue(Oren, 2003).

II.1 - La découverte de P53

P53 est une protéine de 393 acides aminés et de 53kDa qui, dans les premières études à son sujet, n'était détectée dans les cellules qu'après l'induction de leur transformation. Ainsi P53 a été observée pour la première fois en 1979 en tant qu'antigène spécifique de certains sarcomes induits chimiquement dans les souris (DeLeo et al., 1979). Elle a été également trouvée dans les cellules transformées par certains virus (Lane and Crawford, 1979; Linzer et al., 1979) et surtout complexée à l'antigène Large-T du SV40 (Harlow et al., 1981; Oren et al., 1981). P53 a aussi été trouvée dans les cellules transformées par des agents chimiques et dans les cellules tumorales (Crawford et al., 1981).

P53 a d'abord été décrite comme une protéine nucléaire (Dippold et al., 1981). Mais par la suite il a été montré que P53 est cytoplasmique dans les cellules normales et est transloqué au noyau dans les cellules transformées (Rotter et al., 1983).

En 1981, on suggère déjà (Dippold et al., 1981) le rôle de P53 dans la régulation de la division cellulaire et son altération dans les cellules cancéreuses. La découverte d'anticorps anti-P53 dans le sérum des patients atteints de cancer (Lane and Crawford, 1979; Crawford et al., 1982) a renforcé cette hypothèse selon laquelle P53 est modifiée dans les cellules cancéreuses (en quantité, type ou présentation) de telle façon qu'elle devienne immunogène. Il a ainsi été qualifié d' "antigène cellulaire des tumeurs".

Le clonage de l'ADNc révélant ainsi la séquence de P53 a ouvert la voie à l'identification des mutations de P53 dans les cancers (Oren and Levine, 1983).

II.2 - *p53* : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ?

II.2.1 - *p53* serait un oncogène ?

Comme nous l'avons vu, P53 a d'abord été trouvé exprimée dans les cellules cancéreuses ou transformées et pas (ou très peu) dans les cellules normales. Son expression était également augmentée en cas de stimulation de la prolifération (Reich and Levine, 1984). En outre, l'inhibition de l'expression de P53 par stratégie antisens affectait la prolifération des cellules (Shohat et al., 1987).

Il était alors logique de penser que P53 était surexprimée dans les cancers et avait donc potentiellement une activité oncogénique. En effet, elle répondait à la définition du proto-oncogène : lorsqu'elle est mutée dans les cellules tumorales, elle est plus exprimée, plus active et plus stable (Jenkins et al., 1985).

Cette hypothèse était de plus confirmée par le fait que la transfection de *p53* (seul ou avec *c -ras*) dans les cellules en culture induisait leur transformation ou leur immortalisation (Eliyahu et al., 1984; Jenkins et al., 1984; Parada et al., 1984; Rovinski and Benchimol, 1988), un pré requis au processus de cancérisation.

II.2.2 - *p53* : un gène suppresseur de tumeur

En réalité *p53* est un gène suppresseur de tumeur et pas un oncogène comme on l'a tout d'abord pensé. En 1989, lors d'un congrès (Levine, 1989), basé sur les travaux de Oren (Eliyahu et al., 1989; Michalovitz et al., 1990), Levine démontre pourquoi *p53* pourrait être un gène suppresseur de tumeur (Finlay et al., 1989) :

- dans de nombreuses tumeurs humaines et murines, *p53* est retrouvé muté voir délété, ce qui altère sa fonction.
- injecté dans des cellules transformées par un oncogène, il peut réverser cet état de transformation.
- comme le gène *rb*, son produit protéique serait inhibé par interaction avec des protéines virales pour conduire à la transformation cellulaire.

Si P53 n'était pas détectée dans les cellules normales c'est parce qu'elle a une conformation différente de P53 dans les cellules tumorales. Les anticorps anti-P53 disponibles à l'époque ne pouvaient se lier qu'à la forme mutée présente dans les cellules cancéreuses et pas à la forme normale.

Dès 1983, l'expression de P53 était corrélée avec la régression de la tumeur (Rotter, 1983).

La mutation de* p53 *dans les cellules cancéreuses induit en fait une perte de fonction de la protéine ce qui fait de* p53 *un gène suppresseur de tumeur.

II.3 - P53 et le cycle cellulaire

Une des fonctions majeures reconnues pour P53 aujourd'hui est son rôle de régulateur du cycle cellulaire.

L'analyse de l'expression de P53 au cours du cycle cellulaire dans des fibroblastes en culture (Reich and Levine, 1984) a montré que la synthèse et la quantité de P53 sont accrues en fin de phase G1, ce qui suggère un rôle pour P53 dans la progression des cellules quiescentes vers un état proliferatif.

Cette hypothèse a ensuite été confirmée : P53 peut induire un arrêt de croissance en étant dirigé vers le noyau où elle bloque les cellules principalement en phase G1 (Baker et al., 1990; Diller et al., 1990; Mercer et al., 1990; Michalovitz et al., 1990; Gannon and Lane, 1991; Martinez et al., 1991). De plus il a été montré que ce blocage peut-être consécutif à un dommage causé à la cellule et notamment s'il induit des lésions au niveau de l'ADN (Kastan et al., 1991).

Dans certaines lignées, l'activation (ou la surexpression) de P53 entraîne par contre l'induction de l'apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991; Polyak et al., 1996) plutôt qu'un arrêt de croissance pour des raisons que nous discuterons plus loin.

Les souris KO pour *p53* présentent des défauts de gamétogénèse et de fermeture du tube neural au niveau de l'embryon (Armstrong et al., 1995).

p53 ***est le gène majeur du maintient de l'intégrité de la cellule il est même nommé "gardien du génome" (Lane, 1992) ou "gardien de la cellule". En cas d'anomalie au niveau de l'ADN, de la cellule ou de son environnement, la protéine P53, en activant ou inhibant diverses voies, organise la réponse cellulaire qui peut être une entrée en phase quiescente, une réparation des dommages ou s'ils sont trop importants l'induction de la mort cellulaire programmée.***

II.4 - P53 et le cancer

p53 est aujourd'hui considéré comme **LE** gène suppresseur de tumeur car il est le gène le plus souvent muté dans les cancers (plus de 50% de la totalité des cancers : voir la banque de données IARC www-p53.iarc.fr/index.html). Les mutations de *p53* donnent un avantage sélectif pour les cellules puisqu'elles ne sont plus réprimées au niveau de leur croissance.

Malgré son rôle majeur dans la cellule, des lignées cellulaires dépourvues de P53 ont été décrites, indiquant que la cellule peut survivre en son absence. De même les souris KO pour *p53* sont plus susceptibles au développement de tumeurs (Donehower et al., 1992).

En raison de sa qualité de suppresseur de tumeur, on a très vite pensé que la réintroduction de P53 dans des cellules tumorales pourrait permettre de réverser le phénotype tumoral. La transfection de *p53* dans des cellules transformées induit un arrêt de leur prolifération dû à un blocage en phase G1 (Mercer et al., 1990; Michalovitz et al., 1990) ou une entrée en apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991), mais parfois dans certaines cellules aucun de ces effets n'est visible (Shaulsky et al., 1991; Cheng et al., 1992).

Les MEFS déficientes pour p53 présentent des anomalies chromosomiques dues à la réplication des centrosomes. Elles présentent des phénotypes similaires à ceux observés dès 1890 par von Hansemann dans les cellules cancéreuses.

En raison de son activité primordiale pour la cellule, les mutations de P53 procurent un avantage sélectif aux cellules tumorales, ce qui explique son rôle majeur dans le processus de cancérisation. Malgré les très nombreuses études menées depuis longtemps à son sujet, les thérapies anticancéreuses reposant sur P53 ne sont pas disponibles à l'heure actuelle. On peut imaginer vouloir restaurer la fonction de P53 (ajout de P53 WT ou modification de P53 mutante de manière à lui donner une activité sauvage), ou cibler et inactiver les cellules déficientes en P53. Cette approche a déjà donné des résultats prometteurs avec entre autres l'utilisation du ONYX-015 qui cible les cellules déficientes en P53.

II.5 - P53 est un facteur de transcription

II.5.1 - La découverte de l'activité de facteur de transcription

Dès les premières études réalisées sur P53 il a été montré qu'elle pouvait lier l'ADN (Lane, 1983; Steinmeyer and Deppert, 1988). Mais ce n'est qu'avec l'utilisation de protéines de fusion que l'on a pu montrer que P53 peut activer la transcription de gènes rapporteurs (Raycroft et al., 1990) notamment par sa partie N-terminale (Fields and Jang, 1990; O'Rourke et al., 1990). La démonstration selon laquelle la liaison de P53 à l'ADN est indispensable à l'induction de la transcription est due à l'équipe de Prives (Farmer et al., 1992).

II.5.2 - Le site consensus de liaison de P53 sur l'ADN

Il a été montré que P53 se lie sur une séquence spécifique de l'ADN (Bargonetti et al., 1991; Kern et al., 1991) contenant certaines bases critiques dont des guanines. La séquence consensus comporte 2 motifs palindromiques :

5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' séparés par 0 à 13 pb (el-Deiry et al., 1992).

P53 possède 2 homologues, P63 et P73 (Kaghad et al., 1997; Yang et al., 1998), qui peuvent se lier à cette même séquence mais transactivent d'autres gènes, probablement en raison de cofacteurs différents (Mondal and Parvin, 2005). Ils sont, tout comme P53, capables d'induire l'apoptose (Jost et al., 1997).

II.5.3 - Un facteur de transcription sous forme tétramérique

P53 peut s'oligomériser (Levine, 1989) et se tétramériser (Stenger et al., 1992).

Le monomère, bien qu'ayant une activité transactivatrice, n'est pas capable de se lier à l'ADN. On a d'abord pensé que P53 lie l'ADN sous forme homodimérique (Tarunina and Jenkins, 1993) mais il s'avère en fait que c'est un tétramère de P53 qui se lie aux deux motifs du consensus (Friedman et al., 1993; Hainaut et al., 1994; Hupp and Lane, 1994).

La fonction d'activateur de transcription de P53 est autorégulée par la partie C-terminale de la protéine qui joue un rôle inhibiteur en masquant le domaine de liaison à l'ADN (Hupp et al., 1992; Bayle et al., 1995; Wolkowicz et al., 1995).

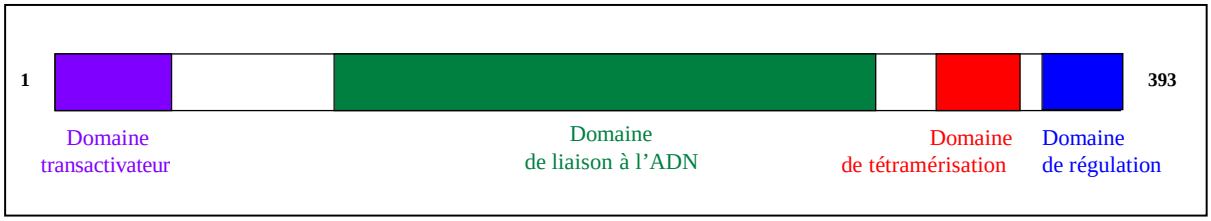


Figure 4 : Structure de la protéine P53

II.5.4 - Les gènes de réponse à P53

II.5.4.1 - Généralités

mck a été le premier gène pour lequel il a été montré que la liaison de P53 sur une zone déterminée de son promoteur pouvait induire sa transcription (Zambetti et al., 1992).

Depuis, il a été montré que P53 transactive un grand nombre de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose. Ces gènes codent entre autres pour : P21/Waf1/Cip1, Bax, Fas-R, GADD45, PUMA, NOXA, MCK, IGFBP3, 14-3-3, TRAF4, APAF-1, PIG3, MDM2, Killer/DR5, TRAIL Receptor 2, TGF-alpha, Endothelin-2 et beaucoup d'autres protéines).

P53 est aussi capable de réprimer l'expression de gènes cibles (Ginsberg et al., 1991). Ainsi l'expression des ARNm codant pour MDR1, c-myc, IL-6, Bcl2 ou Bcl-Xl est régulée négativement par P53 (Ginsberg et al., 1991; Mercer et al., 1991; Santhanam et al., 1991; Haldar et al., 1994). Le mode de répression est pour l'instant moins bien connu que celui permettant la transactivation des gènes cibles ; on sait toutefois que P53 peut lier le facteur initiateur de la transcription TBP ainsi que le régulateur NF-Y et ainsi inhiber la transcription de gènes qui ne présentent pas de site de liaison pour P53 (Seto et al., 1992) (Imbriano et al., 2005).

Il existe des gènes régulés par 2 sites de liaison de P53 : l'un transactivateur et l'autre répresseur, c'est notamment le cas de PCNA (Jackson et al., 1994).

Différentes approches biologiques ou informatiques ont été utilisées de façon à identifier le plus grand nombre de gènes régulés par P53 (Zauberman et al., 1995; Amson et al., 1996; Kostic and Shaw, 2000; Zhao et al., 2000; Kannan et al., 2001; Kannan et al., 2001; Wang et al., 2001; Hoh et al., 2002; Yoon et al., 2002; O'Farrell et al., 2004; Miled et al., 2005).

Parmi les gènes activés ou réprimés, il existe une grande variété de modes de réponse à P53 : le temps et le mode de réponse varient d'un gène à l'autre mais on peut les regrouper en grandes classes (Yu et al., 1999; Yoon et al., 2002). D'un côté, ceux activés ou réprimés de façon précoce, en opposition à ceux dont la transcription est modifiée après un certain délai.

Certains ont également une réponse biphasique : ils sont tout d'abord activés puis réprimés (ou inversement).

II.5.4.2 - Le gène *p21/waf1/cip1*

P21-Waf1-Cip1 est une protéine de 21 kDa dont le gène est une cible de P53 (el-Deiry et al., 1993). Le promoteur de *p21* contient en effet un site transactivé par P53. P21 est capable tout comme P53 d'induire l'arrêt de croissance de cellules en culture. L'activation de P21 est indispensable pour que P53 ait son activité anti-proliférative dans les cellules cancéreuse humaines (Waldman et al., 1995). L'inactivation de p21 conduit les cellules plutôt vers l'apoptose (Polyak et al., 1996).

On a tout d'abord cru que l'induction de P21 lors de l'arrêt de croissance ou l'induction de l'apoptose passait forcément par P53 (el-Deiry et al., 1994), mais il a par la suite été montré que P21 peut être activée par des voies indépendantes de P53 (Michieli et al., 1994).

P21 interagit avec les cyclines et est un inhibiteur des Kinases cycline dépendantes Cdk (Harper et al., 1993). P21 peut induire l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire.

II.5.4.3 - Les gènes *tsip* et *tsap*

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de cancérisation et notamment ceux relatifs à P53, notre équipe a entrepris d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la voie P53 et d'en étudier certains plus finement.

Pour cela nous avons utilisé un modèle cellulaire particulier venant du laboratoire de Moshe Oren. Dans ce système, les cellules LTR6 sont stablement transfectées avec un *p53* muté. Ce gène code pour une protéine P53-Val135 thermosensible (Michalovitz et al., 1990; Milner and Medcalf, 1990). Lorsque les cellules sont cultivées à 37°C, P53 est inactive ; par contre lorsqu'elles sont cultivées à 32°C, la protéine adopte une conformation qui lui permet d'avoir une activité normale de suppresseur de tumeur (Yonish-Rouach et al., 1991). Cette activation induit l'entrée en apoptose des cellules LTR6.

En utilisant la technique de *Differential Display* nous avons pu mettre en évidence l'expression différentielle de gènes entre les cellules où P53 est inactive et celles où elle est activée (Amson et al., 1996). Certains de ces gènes étaient déjà connus pour être induits par P53, mais d'autres n'avaient encore jamais été décrits.

Les gènes activés par P53 ont été nommés *tsap* (*Tumor Suppression Activated Pathway*) : ce sont des gènes qui participent potentiellement à la suppression du phénotype tumoral. A l'inverse les gènes inhibés par P53 ont été nommés *tsip* (*Tumor Suppression Inhibited Pathway*) : ce sont des gènes qui favoriseraient le phénotype tumoral.

C'est de l'étude de deux de ces gènes,* tsap3 *(*siah-1b*) et* tsap6*, dont nous parlerons plus en détail dans ce manuscrit.

II.6 - Les activités de P53 indépendantes de la transcription

Outre son rôle majeur de facteur de transcription, P53 possède d'autres fonctions (Caelles et al., 1994; Bissonnette et al., 1997). Ainsi il a été décrit une activité pro-apoptotique de P53 qui ne passe pas par la transactivation de gènes (Haupt et al., 1995; Baptiste et al., 2002). Il a également été suggéré que durant l'apoptose, P53 pourrait se lier à la mitochondrie (Moll and Zaika, 2001), ce qui pourrait expliquer pourquoi dans certains cas l'apoptose induite par P53 ne passe pas par la néo-synthèse d'ARNm (Regula and Kirshenbaum, 2001).

II.6.1 - La régulation de l'activité d'autres protéines

L'activité pro-apoptotique de P53 passe aussi par sa capacité à promouvoir la translocation du récepteur Fas/CD95 du cytoplasme à la membrane plasmique où il acquiert son activité (Bennett et al., 1998). P53 peut également induire le transport de TNF-R1 à la membrane.

De même, P53 peut induire la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax du cytoplasme à la mitochondrie (Schuler et al., 2000). La présence de Bax à la mitochondrie est indispensable au relargage du cytochrome C et au déclenchement de l'apoptose.

L'activité pro-apoptotique mais transcription indépendante de P53 passe entre autres par la caspase-8 (Ding and Fisher, 2001).

II.6.2 - La réparation de l'ADN

P53 est capable de lier diverses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (XBP, XPD, WRN, DNA polymérase α, RPA)

De plus, P53 possède des propriétés intrinsèques qui lui permettent de détecter (Degtyareva et al., 2001) et de réparer elle même certains dommages de l'ADN (Willers et al., 2000; McKay et al., 2001). Elle aide notamment à la résolution des jonctions de Holliday (Lee et al., 1997; Yang et al., 2002; Sengupta et al., 2003) et de certaines coupures double brins (Dahm-Daphi et al., 2005).

En outre, P53 est dotée d'une activité 3'-5' exonucléase (Mummenbrauer et al., 1996) et de transfert de brin (Oberosler et al., 1993).

II.6.3 - Les autres fonctions de P53

Il a également été décrit que P53 est impliquée dans la sénescence (Itahana et al., 2001; Tyner et al., 2002), la différentiation (Almog and Rotter, 1997), l'inhibition de l'angiogénèse (Duda et al., 2002), …

II.7 - La régulation de P53

Pour revue voir (Oren, 1999)

Dans les cellules où P53 est à l'état latent, elle n'interfère pas avec le cycle cellulaire. Son niveau d'expression basale est relativement bas.

La régulation de P53 se fait de façon quantitative aux niveaux transcriptionnel et traductionnel, mais aussi qualitative car P53 est régulée par des modifications post-traductionnelles.

II.7.1 - La régulation au niveau transcriptionnel

p53 possède un promoteur "classique" en amont du site d'initiation de la transcription, mais également un promoteur dans son premier intron (Reisman et al., 1988; Tuck and Crawford, 1989). Le premier ne comporte pas de TATA-box, mais une CAAT-box.

Le promoteur de *p53* est régulé par des facteurs de transcription de la famille hélice-boucle-hélice (Ronen et al., 1991) ainsi que par c-myc (Reisman et al., 1993), et il est activé en cas de stimulation par le sérum (Reich and Levine, 1984; Ginsberg et al., 1990).

On a longtemps pensé que seuls les gènes *p63* et *p73* pouvaient produirent différents ARNm par épissage alternatif (Yang et al., 1998). Il a en fait été montré que p53 peut également subir ce type de régulation (Ghosh et al., 2004).

P53 est induite par de nombreux signaux, souvent des signaux de stress. Des dommages à l'ADN, au fuseau mitotique, des chocs thermiques, osmotiques ou chimiques peuvent aussi induire la transcription de *p53*. Dans certains cancers il a été noté des différences de régulation transcriptionnelle de *p53* (Nayak and Das, 1997) : l'abondance de certains facteurs de transcription liés au promoteur de *p53* varie entre des tissus sains et des tissus cancéreux. Il y a même des facteurs de transcription que l'on ne trouve liés à cette région que dans les tumeurs.

II.7.2 - La régulation au niveau traductionnel

En raison de la rapidité de la réponse à certains signaux, il a été supposé qu'une partie de la régulation pouvait se faire par une augmentation de la traduction de l'ARNm *p53*, probablement due à une dérépression de sa région 3'-UTR (Fu et al., 1996). Il est aussi connu que P53 s'autorégule par liaison à son propre ARNm (Mosner et al., 1995).

II.7.3 - La régulation au niveau post-traductionnel

P53 est une protéine hautement régulée au niveau post-traductionnel par des modifications covalentes. Elle peut être phosphorylée, mono- ou poly-ubiquitinée, sumoylée, acétylée, …

La protéine P53 WT est capable de présenter des conformations différentes (Milner and Medcalf, 1991), ce qui suggère que la régulation de l'activité de P53 passe par des modifications post-traductionnelles affectant entre autres son repliement tridimensionnel.

II.7.3.1 - La phosphorylation de P53

La phosphorylation est considérée comme la modification majeure permettant de réguler P53.

Chez l'humain, au moins 7 serines et 2 thréonines dans le domaine transactivateur et 5 serines dans le domaine C-terminal sont susceptibles d'être phosphorylées. Les serines 15 et 20 ainsi que la threonine 18 sont des sites de phosphorylation majeurs. Il faut noter que la Thréonine 55 serait phosphorylée à l'état basal mais déphosphorylée lors de l'induction de dommages à l'ADN.

Notons que la Serine 378 est constitutivement phosphorylée.

Suivant son état de phosphorylation, P53 transactive différents gènes cibles (Lohrum and Scheidtmann, 1996; Oda et al., 2000).

Différentes kinases sont capables d'induire la phosphorylation de P53 : ATM, ATR, PKR, Chk-1, Chk-2, p34 Cdc2, p38 MAPkinase, JNK, DNA-PK, caséine kinase-1-δ …et des phosphatases de la supprimer : hCdc14,

II.7.3.2 - L'acétylation de P53

P53 peut aussi être acétylée suite à différents stimuli (Prives and Manley, 2001), ce qui augmente sa capacité à lier l'ADN (Gu and Roeder, 1997; Sakaguchi et al., 1998). Les lysines 320, 373 et 382 de la protéine humaine sont connues pour être acétylées par CBP et PCAF et déacétylées par HDAC1, 2 et 3. Cette acétylation régulerait la stabilité de P53.

II.7.3.3 - La méthylation de P53

P53 peut être méthylée sur une lysine en C-terminal par la Set9 methyltransférase. Ainsi modifiée, la protéine est confinée dans le noyau et stabilisée (Chuikov et al., 2004).

II.7.3.4 - L'ubiquitination de P53

II.7.3.4.1 - La poly-ubiquitination et la dégradation de P53 par le protéasome

La stabilisation de la protéine est une voie majeure de régulation (Ashcroft et al., 2000).

Lors de l'activation de P53 sa demi-vie est nettement augmentée (Maltzman and Czyzyk, 1984; Kastan et al., 1991), ce qui permet une activation rapide sans passage par une néo-synthèse. Ce sont notamment des phosphorylations qui empêchent son ubiquitination et donc sa dégradation par la voie du protéasome (Shieh et al., 1997; Shieh et al., 1999; Unger et al., 1999).

A l'inverse, une fois son action achevée, P53 est rapidement dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (Maki et al., 1996).

II.7.3.4.2 - La mono-ubiquitination de P53

P53 peut être mono-ubiquitinée, ce qui entraîne sa translocation du noyau vers le cytoplasme (Li et al., 2003).

L'activité anti-proliférative exercée par P53 n'est possible que lorsqu'elle est localisée au noyau (Shaulsky et al., 1991). Or à l'état latent, P53 est cytoplasmique durant la majorité du cycle cellulaire (Shaulsky et al., 1990).

II.7.3.5 - Les autres modifications de P53

P53 peut également être sumoylée, ribosylée, neddylée et O-glycosylée (Shaw et al., 1996; Wesierska-Gadek et al., 1996; Melchior and Hengst, 2002; Feng et al., 2005).

Les différentes modifications post-traductionnelles ainsi que les différents cofacteurs de P53 influencent grandement et rapidement sa stabilité, sa localisation et sa fonction.

II.7.4 - La régulation par la boucle Mdm2 : une balance subtile

Pour revue voir (Alarcon-Vargas and Ronai, 2002).

Mdm2 est le produit d'un oncogène souvent activé dans les phénomènes de cancer (Watanabe et al., 1996; Momand et al., 1998). C'est une E3 ligase, protéine qui induit la dégradation de P53 par la voie ubiquitine-protéasome (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997).

Mdm2 est capable d'inhiber P53 en se liant à son domaine transactivateur (Momand et al., 1992; Chen et al., 1996) et en inhibant ainsi la liaison d'éléments de la machinerie transcriptionnelle (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995).

L'importance du lien entre P53 et Mdm2 a été mis en évidence par l'étude des souris transgéniques : les souris KO pour Mdm2 présentent une forte létalité embryonnaire, qui disparaît totalement lorsque l'on inactive conjointement les gènes *p53* et *mdm2* (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995).

P53 et Mdm2 doivent toutes deux être dans des états de phosphorylation particuliers pour pouvoir interagir. La régulation de la quantité et de l'état de phosphorylation de Mdm2 est donc très importante pour l'activité de P53 (Ashcroft et al., 2000). Ce serait par ce mécanisme que la cellule maintiendrait un niveau basal relativement bas de P53.

De plus, un niveau bas de Mdm2 résulterait en une mono-ubiquitination de P53 entraînant son export du noyau vers le cytoplasme (Li et al., 2003).

ARF est une protéine surexprimée lorsque diverses protéines oncogéniques sont elles-mêmes sur-activées (de Stanchina et al., 1998; Palmero et al., 1998; Zindy et al., 1998). Ainsi induite, ARF va se lier à Mdm2 qu'elle empêche d'agir sur l'ubiquitination de P53 (Zhang and Xiong, 2001).

De façon *a priori* paradoxale P53 active la transcription du gène *mdm2* (Barak et al., 1993; Zauberman et al., 1995). Il résulte de cette double action une boucle de régulation qui permet de contrôler finement l'activité de P53 (Figure 5) (Wasylyk et al., 1999).

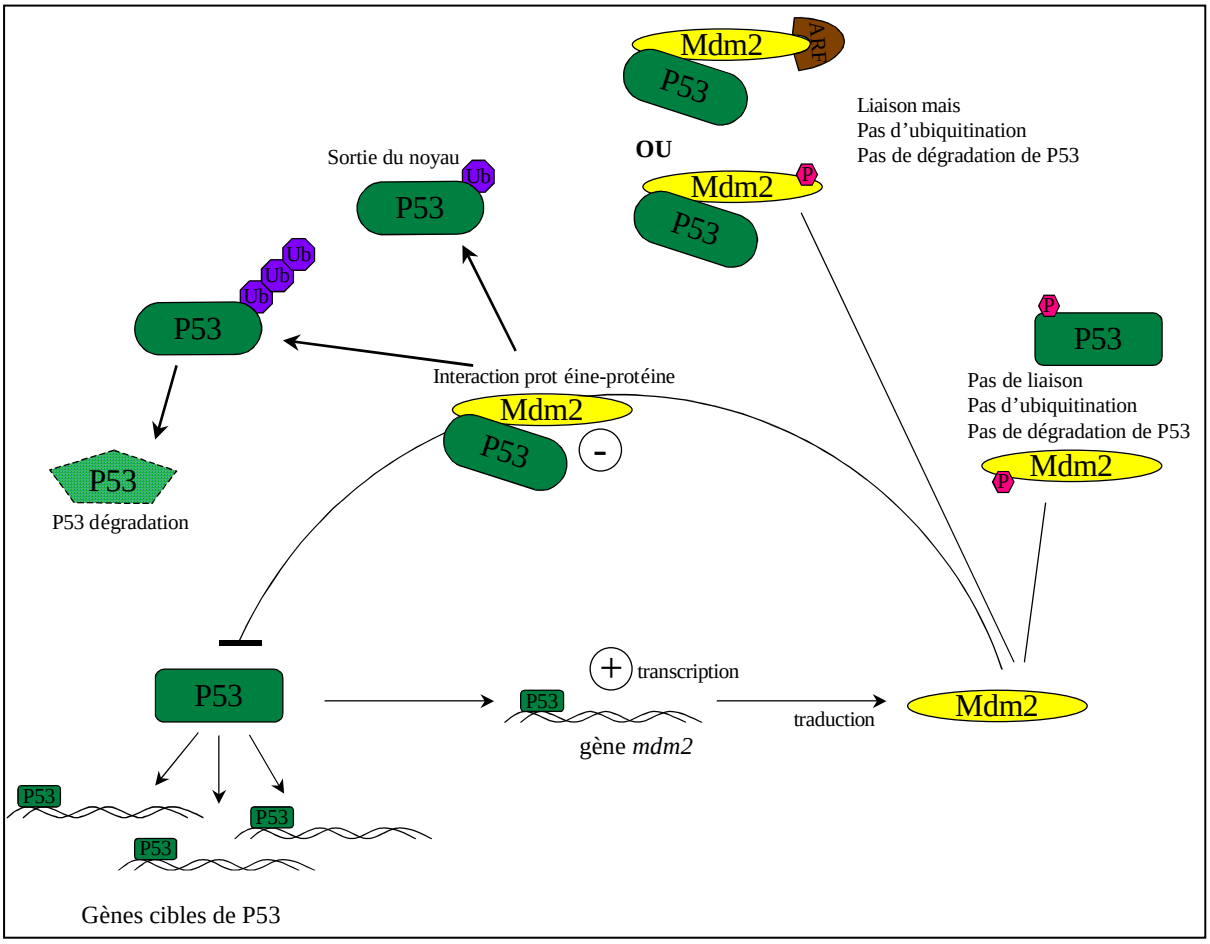


Figure 5 : La boucle P53/Mdm2

II.7.5 - <u>La régulation de la fonction de P53</u>

II.7.5.1 - <u>Les conditions de l'activation de P53</u>

P53 réagit à de nombreux stress cellulaires tels : les dommages à l'ADN, l'hypoxie, la déplétion en nucléotides, l'infection virale, les agents alkylants, … Ces stress induisent généralement une stabilisation de la protéine et sa direction vers le noyau où elle transactive les gènes appropriés pour réagir à ces signaux. En effet la plupart des modifications que nous avons évoqué interviennent suite à l'induction de dommages à l'ADN.

Mais des dommages à l'ADN induits par des agents différents (UV, radiations ionisantes, agents chimiques, …) induisent des réponses différentes. Par exemple la phosphorylation en S392 intervient suite à un dommage causé par les UV mais pas par les radiations, contrairement à celles en S15 ou S20. Ceci permet une réponse finement appropriée au stimulus.

Pour avoir son activité transcriptionnelle, nous l'avons déjà évoqué, P53 doit être dans le noyau, mais surtout être sous forme tétramérique. Les modifications induisant une perte de charges basiques que sont les acétylations, sumoylations, ou l'addition de charges négatives par phosphorylation peuvent induire des changements de conformation qui modifient l'interaction du domaine C-terminal régulateur avec le domaine de liaison à l'ADN (Hupp and Lane, 1995; Gu and Roeder, 1997; Waterman et al., 1998). Mais le domaine N-terminal transactivateur, peut aussi être régulé par la liaison de cofacteurs (Lambert et al., 1998; Hupp, 1999; Jayaraman and Prives, 1999; Prives and Hall, 1999). P53 aurait ainsi besoin de ses homologues P63 et P73 pour induire la transcription de certains gènes (Flores et al., 2002).

II.7.5.2 - La balance apoptose/arrêt de croissance

Une fois activée, P53 peut conduire la cellule vers un simple arrêt de croissance ou une mort cellulaire programmée. Le choix de l'une ou l'autre des voies serait plus due au contexte cellulaire qu'à P53 elle même. La présence de signaux de survie préserverait la cellule de la mort. Mais le génotype de la cellule a aussi une grande importance, puisque P53 a besoin de différents effecteurs pour conduire la cellule vers l'une ou l'autre des voies (Figure 6).

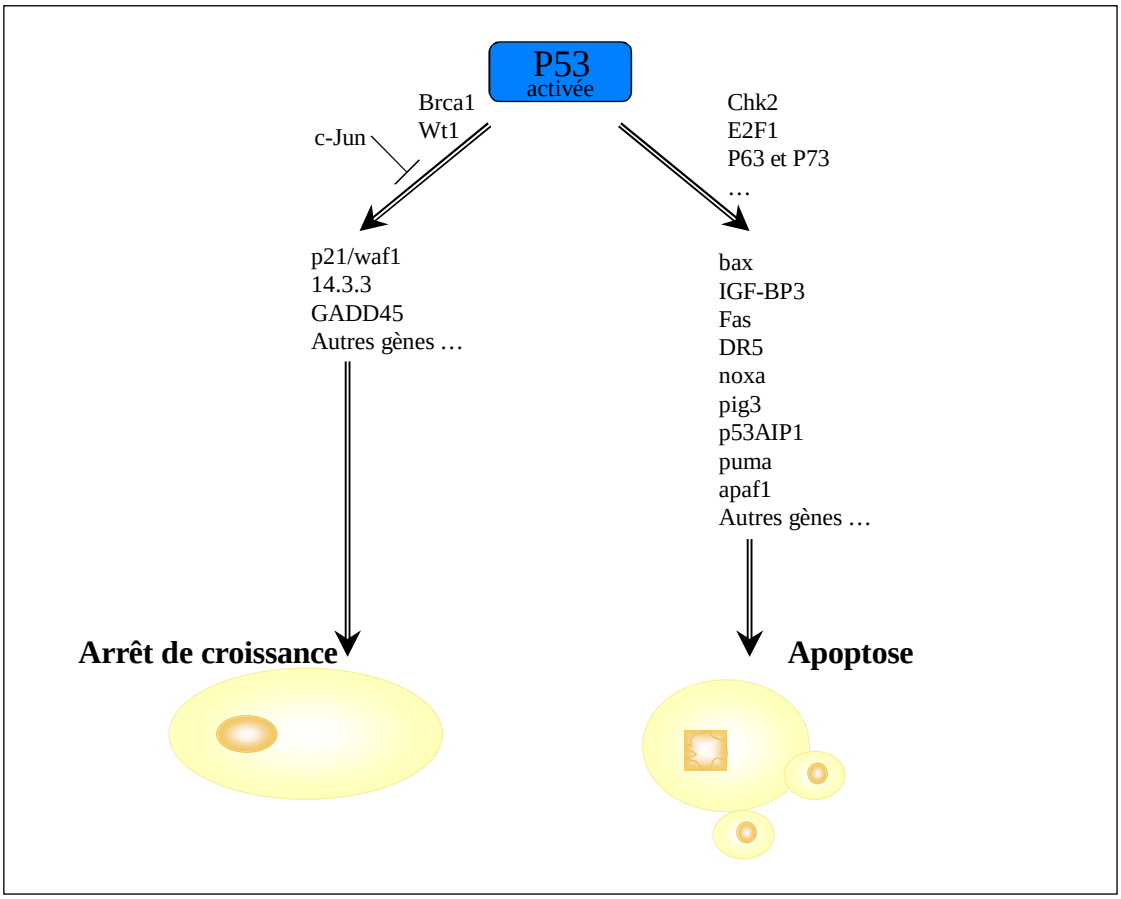


Figure 6 : La balance apoptose/arrêt de croissance

Les modifications post-traductionnelles de P53 sont aussi des éléments majeurs de son activité pro-apoptotique ou de blocage du cycle. Ainsi la phosphorylation en Serine 20 par Chk2 est requise pour l'entrée en apoptose mais pas pour l'arrêt de croissance (Jack et al., 2002).

II.8 - Une activité anti-apoptotique paradoxale de P53

Cette activité surprenante de P53 a été relevée dans différents cas.

La première observation est que certaines cellules P53 nulles répondent mieux aux signaux pro-apoptotiques que des cellules ayant une P53 fonctionnelle (Malcomson et al., 1995; Vikhanskaya et al., 1995; Lassus et al., 1999).

Une hypothèse retenue pour expliquer cet effet paradoxal repose sur la fonction de réparation de l'ADN présentée par P53. Les dommages à l'ADN, s'ils ne sont pas réparés au bout d'un certain temps, déclenchent le processus apoptotique. Or, si P53 est capable de réparer certains d'entre eux, l'apoptose n'a plus lieu d'être induite.

Des expériences dans lesquelles il a été montré que P53 protège les cellules de l'apoptose induite par des agent génotoxiques en agissant sur la réparation viennent étayer cette hypothèse (McKay et al., 2001).

Une deuxième explication fait intervenir l'activité de frein de la prolifération cellulaire de P53. En effet, l'effecteur majeur de P53, P21, est connu pour augmenter la survie cellulaire face à des agents génotoxiques et pro-apoptotiques (Gorospe et al., 1997; Bissonnette and Hunting, 1998; Bunz et al., 1998; Bunz et al., 1999; Mariette et al., 2002) (Polyak et al., 1996; Wang et al., 1999). P53 active aussi la transcription de gènes anti-apoptotiques tels DcR2 (Meng et al., 2000) ou HB-EGF (Fang et al., 2001).

II.9 - Les dernières découvertes liées à P53

En raison de son rôle majeur dans le développement du cancer, de nombreuses études ont été menées pour tenter de tuer les cellules portant un *p53* mutant ou de réactiver celui-ci de façon à induire l'arrêt de croissance. Ces recherches n'ont jusqu'à aujourd'hui permis aucun développement notable. Pourtant beaucoup d'équipes continuent à explorer cette voie. Ainsi une nouvelle famille de molécules à récemment été décrite pour induire l'arrêt de croissance de cellules portant un certain type de mutation de *p53* (Myers et al., 2005).

Des études sur des souris KO pour *p53* ont montré que P53 serait un inhibiteur de la réponse immunitaire innée (Zheng et al., 2005).

Il semblerait que, dans certaines cellules au moins, la translocation de P53 à la mitochondrie soit bien plus précoce que sa translocation au noyau (Zhao et al., 2005). Elle y serait capable de réparer les excisions de bases de l'ADN mitochondrial (de Souza-Pinto et al., 2004).

La génération d'un type particulier de souris *knock-in* pour *p53,* permettant de réguler très rapidement son activité, a mis en évidence le caractère oscillatoire de la réponse de P53 aux dommages induits à l'ADN (Christophorou et al., 2005).

P53 est donc une protéine hautement régulée, dont la fonction majeure est de réguler la transcription de gènes cibles en réponse à différents stress pour induire une réponse adaptée. Les deux réponses principales sont l'arrêt de croissance et l'apoptose.

La dérégulation de la quantité ou de la fonction de P53 sont des éléments majeurs du développement de la plupart des cancers. Ces deux aspects de la protéine peuvent être modifiés par des changements des voies de régulation ou des sites de modification de P53. Les mutations affectent particulièrement le domaine de liaison à l'ADN et donc la fonction majeure de P53 de régulateur de la transcription.

Nous avons choisi d'étudier la régulation et la fonction de 2 protéines que nous avons trouvé régulées par P53 : Siah et TSAP6.

Introduction aux gènes *siah*

III - Introduction aux gènes *siah*

III.1 - Une famille de gènes fortement conservés

III.1.1 - Le membre fondateur : le gène *sina* de drosophile

L'étude du développement de l'œil de drosophile a mis en évidence une cascade d'événements conduisant à la formation d'unités répétées composées de photorécepteurs et de cellules non-neuronales.

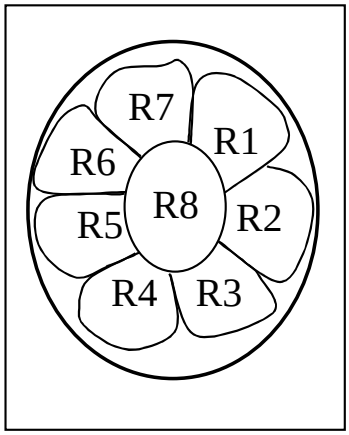


Figure 7 : Représentation d'une ommatidie d'oeil de drosophile

La différentiation d'un de ces photorécepteurs, le R7, dépend du gène *seven in absentia (SINA)*; lorsqu'il est muté, les cellules ne peuvent se différencier en R7 (Carthew and Rubin, 1990). Outre l'absence de développement du récepteur R7, les mutants *sina* présentent une absence de soies à la surface du corps, une réduction de la durée de vie par 10, un comportement léthargique et une stérilité chez les deux sexes (Carthew and Rubin, 1990).

La fonction de Sina est de transmettre le signal venant des récepteurs de type tyrosine kinase Sevenless et Ras.

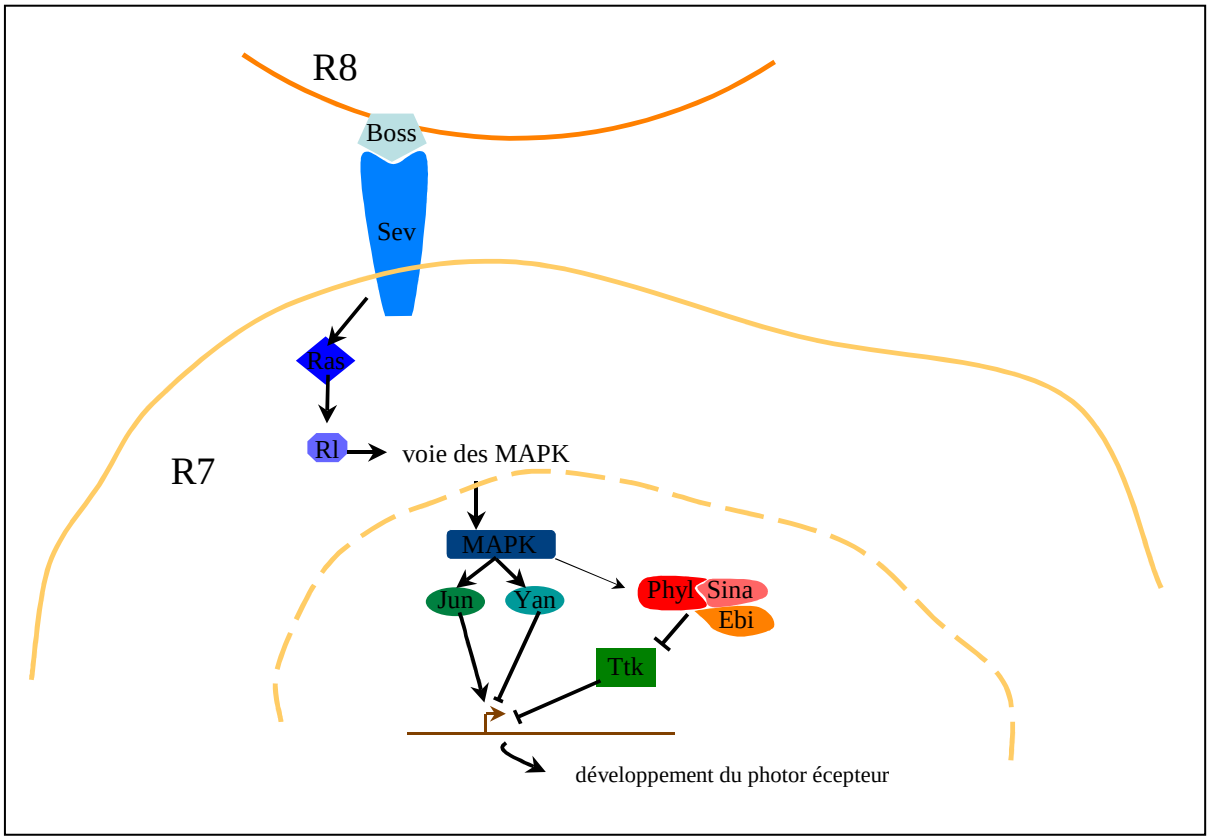


Figure 8 : Voie d'activation conduisant au développement du photorécepteur R7

III.1.2 - <u>Les homologues chez les mammifères</u>

Chez les mammifères on trouve 3 homologues pour *sina* : ils sont nommés *siah-1a*, *siah-1b* et *siah-2*. *siah-2* a une séquence légèrement différente des 2 gènes *siah-1* qui eux sont hautement similaires.

Un récapitulatif des homologies entre quelques ARNm et protéines de la famille Siah est présenté dans Tableau 1 *page 36.*

III.1.2.1 - <u>Les gènes</u> <u>siah-1</u>

III.1.2.1.1 - <u>Siah-1 chez la souris</u>

Le génome de la souris possède 2 gènes et 2 pseudogènes de la famille *siah-1*. Les 2 pseudogènes comportent un grand nombre de codons stop dans leur phase ouverte de lecture et ne sont donc pas exprimés (Della et al., 1993). Les 2 gènes *siah-1* exprimés sont nommés *siah-1a* et *siah-1b*.

Siah-1a se trouve sur le chromosome 8 alors que *siah-1b* se trouve sur le chromosome X (Abbott and Chambers, 1994; Holloway et al., 1997).

Siah-1a et *siah-1b* produisent des ARNm très similaires, ne différant que de 25 nucléotides (sur 846) dans leurs séquences codantes, celles-ci codant pour des protéines de 31kDa ayant seulement 6 acides aminés de différence. La comparaison des séquences des ADNc avec les séquences génomiques permet de montrer que *siah-1a* et *siah-1b* possèdent la même structure que le gène *sina* (2 exons et 1 intron).

***NB : L'utilisation dans ce texte du terme* siah-1 *chez la souris fait référence à la fois au gène* siah-1a *et au gène* siah-1b.**

III.1.2.1.2 - *Siah-1 chez l'humain*

On a longtemps pensé que le génome humain ne portait qu'un seul gène *siah-1*. Le gène murin le plus proche de *hsiah-1* serait *msiah-1a (Holloway et al., 1997; Hu et al., 1997)* car au niveau des acides aminés où mSiah-1a diffère de mSiah-1b, mSiah-1a est toujours identique à hSiah-1. De même pour les différences en 3' UTR.

Il a récemment été découvert un autre gène *siah-1* sur le chromosome X, et homologue de *msiah-1b*. Toutefois, il s'est révélé n'être qu'un pseudogène (Yano et al., 2005).

L'unique gène *hsiah-1* est donc localisé sur le chromosome 16q12 (Banfi et al., 1996; Nemani et al., 1996; Hu et al., 1997). Il est composé de 2 exons séparés par un intron de 14,5kb. Seul le second exon est codant (Hu et al., 1997).

Un test de protection à la RNAse a montré la présence de 2 transcrits induits par P53 (Matsuzawa et al., 1998). Ces 2 formes résultent de la présence de 2 ATG dans la séquence de *hsiah-1*. L'ARNm le plus long a été désigné *hsiah-1L* (Iwai et al., 2004). Il comporte 48 nucléotides de plus que *siah-1*.

III.1.2.2 - *Le gène* siah-2

Le gène *msiah-2*, localisé sur le chromosome 3, possède un intron de 18kb.

hsiah-2 est localisé sur le chromosome 3q25 (Holloway et al., 1997; Hu et al., 1997) et est aussi composé de 2 exons codants séparés par un intron de 9,8kb.

Une analyse par Southern blot révèle 2 gènes relatifs à *siah-2* (plus qu'à *siah-1*) dans le génome humain (Holloway et al., 1997), ils seraient des pseudogènes.

	sina		**hsiah-1**		**hsiah-2**		**msiah-1a**		**msiah-1b**		**msiah-2**		**xsiah-2**		**zsiah**	
***gène* / protéine**	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA	ARN	AA
sina (drosophile) NM_057377 P21461	x	x	74	86	76	85	72	86	73	86	78	85	75	84	76	85
hsiah-1 (humain) NM_003031 AAH35562			x	x	76	86	92	99	91	98	76	86	74	87	74	88
hsiah-2 (humain) NM_005067 O43255					x	x	76	93	75	92	92	83	81	80	79	95
msiah-1a (souris) NM_009172 CAA79630							x	x	97	98	75	86	76	87	75	88
msiah-1b (souris) NM_009173 CAA79631									x	x	75	83	76	87	72	85
msiah-2 (souris) Z19581 Q06986											x	x	80	79	79	95
xsiah-2 (xénope) AF155509 Q9I8X5													x	x	76	93
zsiah (poisson zèbre) AF411696 AAN03677															x	x

NB : ARN correspond au pourcentage d'identité entre 2 ARN au niveau de leur séquence codante. AA correspond au pourcentage d'homologie entre 2 protéines au niveau de leur séquence protéique.

***Tableau 1: La conservation des gènes* siah**

Un homologue de *sina* a été trouvé chez *Schistosoma mansoni* (Fantappie et al., 2003). Même chez les plantes on a retrouvé des homologues de *sina*. Ainsi sur le chromosome 5 d'*Arabidopsis thaliana*, le gène *sinat5* (dbEST ID: 439828) a été reconnu pour coder une protéine homologue à Sina (Xie et al., 2002).

Des gènes codant pour des protéines Siah ont aussi été trouvés dans le génome de taureau (Goldammer et al., 2002), de poulet (Neiman et al., 2001), de xénope (Bogdan et al., 2001), de chèvre (Mandon-Pepin et al., 2003), de poisson zèbre (Ro et al., 2003), de riz, de Brassica (Cui et al., 1999; Brugiere et al., 2000; Cui et al., 2000).

L'importante conservation des gènes de la famille* sina *au cours de l'évolution suggère un rôle important pour ces protéines au sein de la cellule.

Nous allons maintenant nous concentrer sur les protéines humaines et murines.

III.2 - Structure des protéines de la famille Siah

III.2.1 - Structure générale

Les protéines Siah sont des protéines de 31kDa.

La structure d'une partie de Siah-1a a été révélée (Polekhina et al., 2002) suite à sa cristallisation à 2,6Å. Elle indique une homologie structurale avec les protéines de la famille TRAF qui sont impliquées dans la transduction du signal depuis les récepteurs au TNFα et à l'IL-1.

Les protéines Siah portent un domaine RING, un domaine en doigts de zinc, un domaine de localisation nucléaire, un domaine de liaison au substrat, un domaine d'oligomérisation, et un site potentiel de liaison à l'ARN.

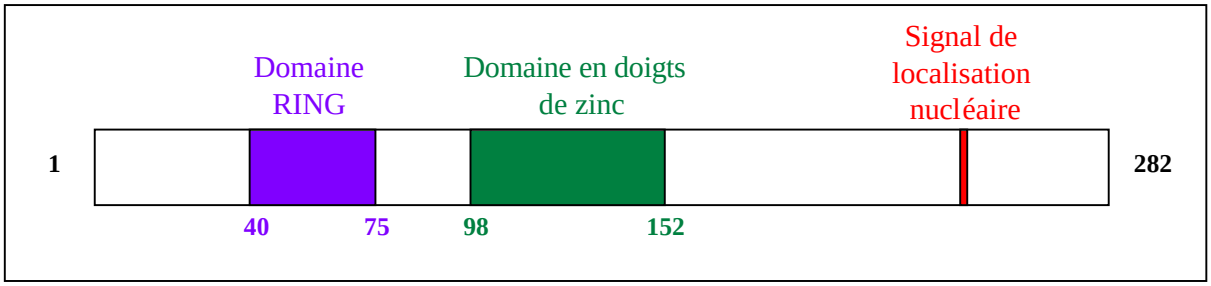


Figure 9 : Structure des protéines Siah

III.2.2 - Un domaine RING

Le domaine RING est défini par un total de 8 cystéines et histidines qui lient 2 ions de zinc.

Des protéines contenant des motifs RING ont été identifiées dans de nombreuses espèces et elles remplissent des fonctions très variées telles que le contrôle de la croissance, la transduction du signal, la pathogénicité virale et la biogénèse des péroxisomes (Borden and Freemont, 1996; Saurin et al., 1996).

Comme il avait été montré pour la protéine de drosophile (Carthew and Rubin, 1990), les homologues de Sina possèdent un domaine RING (Saurin et al., 1996; Borden, 1998; Polekhina et al., 2002).

Le domaine RING des protéines Siah permet l'ubiquitination des protéines cibles via son interaction avec les *ubiquitin conjugating enzymes* (Hu and Fearon, 1999; Lorick et al., 1999) comme nous le verrons plus loin.

III.2.3 - Un domaine de liaison au substrat

L'équipe de Bowtell a décrit pour Siah-1 un domaine de liaison au substrat nommé SBD pour *Substrate Binding Domain*. Il est composé d'un feuillet β à 8 feuilles (Polekhina et al., 2002).

D'autre part, un domaine de liaison à Sina a pu être identifié sur une de ses cibles : Phyl (Kauffmann et al., 1996). La présence d'un domaine homologue a été confirmée sur différentes protéines cibles de Siah/Sina et il s'est révélé effectivement fonctionnel lors d'expériences de mutagenèse (House et al., 2003).

La séquence consensus pour la liaison à Siah a été définie comme étant **PxAxVxP** et a été retrouvée sur SIP, OBF.1, DCC, Synphilin-1 et TIEG1 et une séquence similaire sur Numb, eEF1Bβ, Vav, Kid, N-CoR et FIR. Les autres protéines liant Siah que sont pAPC, la Synaptophysine, mGlutR1 et l'α-tubuline ne présentent pas de séquence homologue à ce consensus.

PROTEIN	PEPTIDE	SEQUENCE
PHYL	(108-130)	QQERTKLRPVAMARPTVRVQPQL
OBF-1	(39-61)	ASSGAAPAPTPVPLPHQPLATYT
SIP	(52-74)	AELLDNEKPAPVPAPITTGYTVK
DCC	(1325-1347)	EEAPSRTIPTPCPRPTHPLRSFA
TIEG1	(193-215)	VEAARKNIPCPAPSPNRSKCERN
NUMB	(334-356)	FSSAPMTKPVTVPAPQSPTFQAN
EF1-δ	(126-148)	APQTQHVSPMRQPEPPAKKPATP
Vav	(640-662)	ATNEVGWFPCNRPRPYVHGPPQD
Kid	(518-540)	TVTGAKPLKKPVPMPLQLIQEQA
N-CoR	(131-153)	VSDSHFQRISPAPLPLVHTLPEG
FIR	(353-375)	VMAAQAPGVITGPTPARPPIPVT
consensus motif		--------P-A-V-P--------

D'après (House et al., 2003)

Figure 10 : Séquence consensuelle des protéines interagissant avec Siah

En utilisant cette séquence consensus, une recherche informatique a permis d'identifier de nouveaux partenaires potentiels de Siah. Parmi eux, la Plectine-1 qui contient le consensus parfait. Cette protéine a par la suite prouvé qu'elle pouvait se lier à Siah *in vitro* (House et al., 2003).

Comme nous le verrons plus loin, les protéines interagissant avec Siah par son SBD ne sont pas forcément dirigées vers la voie du protéasome; certains ligands de Siah ne sont pas dégradés .

III.2.4 - Un domaine d'oligomérisation

Les protéines Sina/Siah sont capables de se dimériser via leur séquence C-terminale (Hu et al., 1997; Matsuzawa et al., 1998; Hu and Fearon, 1999). La constante d'association calculée pour ce dimère est supérieure à 10^{-8} mol^{-1} (Polekhina et al., 2002). C'est l'orientation anti-parallèle d'un feuillet β de chaque monomère qui forme la surface de contact. A

l'interface de dimérisation se trouve une large surface concave qui peut aussi être impliquée dans la liaison à d'autres protéines telles SIP.

III.2.5 - Un domaine de localisation nucléaire

Sina a initialement été décrite comme une protéine nucléaire (Carthew and Rubin, 1990). Nos premières études sur Siah-1 montraient également une accumulation de la protéine dans le noyau (Roperch et al., 1999). De plus il a été décrit pour la plupart des protéines Siah un domaine de localisation nucléaire (Matsuzawa et al., 1998; Fantappie et al., 2003).

L'importance de ce signal de localisation nucléaire était suggéré par l'observation de modifications nucléaires consécutives à la surexpression de Siah-1 (Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999). Mais, comme nous le développerons plus loin (III.6.2.5 - page57), le rôle de ce domaine dans la fonction pro-apoptotique de Siah n'a été démontré que récemment (Hara et al., 2005).

III.2.6 - Un domaine putatif de liaison à l'ARN

Siah-1 porte un domaine similaire au domaine de liaison à l'ARN trouvé dans la protéine WT1 (Kennedy et al., 1996; Nemani et al., 1996).

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été menée à ce jour dans le but de vérifier cette éventuelle interaction de Siah avec l'ARN ni d'en comprendre la fonction.

Comme nous l'avons vu plus haut, des protéines de la famille Siah sont retrouvées dans un grand nombre d'espèces animales comme végétales et présentent une grande conservation de leur séquence. Ceci suggère qu'elles jouent un rôle important au niveau cellulaire. Les protéines Siah semblent impliquées dans des mécanismes cellulaires très variés car elles interagissent avec des protéines très différentes.

III.3 - Les protéines de la famille Siah sont des E3 ligases

Un récapitulatif des partenaires des protéines Siah se trouve dans le Tableau 2 page 60.

III.3.1 - La voie de l'ubiquitination

L'Ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés très conservée au cours de l'évolution. Une cascade enzymatique permet de lier une chaîne de molécules d'Ubiquitine sur les lysines des protéines cibles (Figure 11) pour induire la dégradation de ces dernières par le protéasome (Varshavsky, 1996; Varshavsky, 1997; Ciechanover, 1998; Ciechanover and Schwartz, 1998). L'importance de ce mécanisme a été hautement reconnu cette année puisque le prix Nobel de chimie 2004 a été décerné à ses découvreurs : Ciechanover, Hershko et Rose.

C'est l'action séquentielle de trois enzymes qui conduit à l'ubiquitination des protéines cibles.

La première étape est catalysée par une enzyme E1 (*ubiquitin-activating enzyme*), qui active de façon ATP-dépendente l'extrémité C-terminale de l'Ubiquitine, tout en formant un pont thio-ester avec celle-ci par l'une de ses cystéines. On ne connaît qu'une seule enzyme E1 chez l'homme.

La seconde étape consiste à transférer l'Ubiquitine de l'enzyme E1 vers une cystéine de l'enzyme E2, une *ubiquitin conjugating enzyme*. Il existe plus de 20 enzymes E2.

La dernière étape est réalisée par l'*ubiquitin ligase* E3 qui transfère l'Ubiquitine de l'enzyme E2 vers une lysine de la protéine cible ou vers une autre Ubiquitine déjà accrochée à la protéine cible. C'est l'enzyme E3 qui est spécifique de certaines protéines.

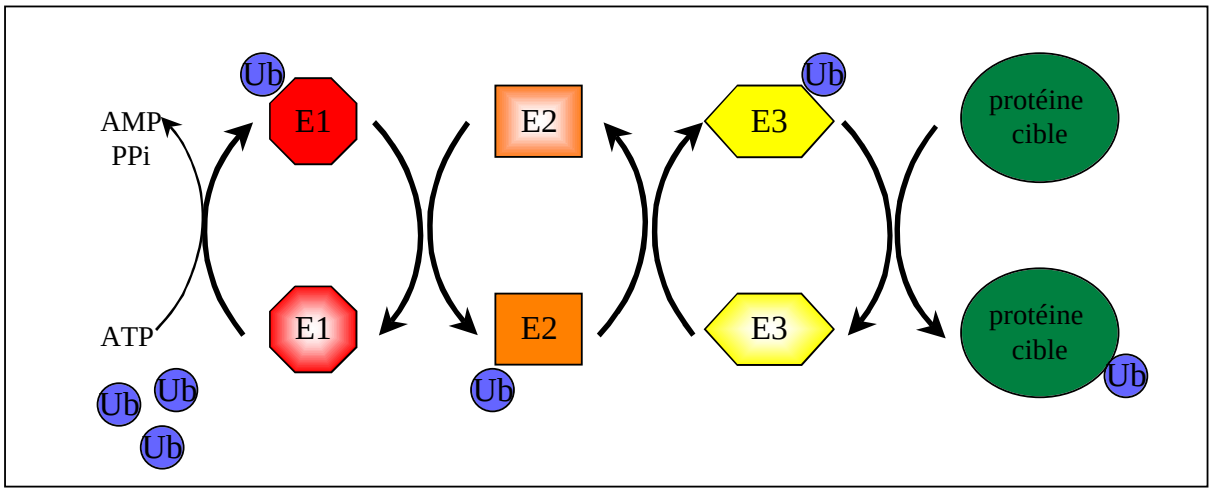


Figure 11 : La réaction d'ubiquitination

III.3.2 - <u>Les E3 ligases</u>

La E3 ligase est un élément clé de l'ubiquitination puisque c'est elle qui donne la spécificité de substrat au processus d'ubiquitination : c'est elle "le cerveau" du processus (Shmueli and Oren, 2005).

Les enzymes E3 ont été classées en 4 groupes :

- l'unité simple de type RING
- le complexe de type RING
- le type à domaine HECT défini par une région C-terminale de 350 acides aminés
- le type à *U-box* défini par un domaine de 70 acides aminés

La plupart des complexes de type RING comportent une sous-unité adaptatrice **S**kp1, une **C**ulline et une **F**-box protéine (FBP) : complexe SCF.

III.3.3 - Les fonctions de l'ubiquitination

Une protéine peut subir une mono- ou une poly-ubiquitination. La modification la plus étudiée et surtout la mieux connue est la poly-ubiquitination.

La poly-ubiquitination conduit les protéines vers le protéasome, une structure cellulaire servant à dégrader les protéines en excès, celles ayant adopté une mauvaise conformation ou celles devenues inutiles à la cellule à un moment donné (Arrigo et al., 1988). Une protéine doit porter une chaîne d'au moins 4 Ubiquitines pour être reconnue et dégradée par la voie du protéasome.

Le motif RING est responsable de l'activité E3 ligase et promeut la dégradation des protéines cibles selon la règle du N-terminal, qui vise à dégrader les protéines qui portent des résidus déstabilisants en N-terminal (Varshavsky, 1996; Xie and Varshavsky, 1999; Kwon et al., 2002).

Notons qu'il existe d'autres voies de dégradation des protéines indépendantes de la voie ubiquitine-protéasome ; elles peuvent faire intervenir des protéases, lysosomes, séquences PEST …

La poly-ubiquitination pourrait être également impliquée dans la réparation de l'ADN et l'activation de kinases (Sun and Chen, 2004).

Il a été montré que la mono-ubiquitination peut conduire les protéines membranaires vers la voie de l'endocytose et la dégradation par les lysosomes. Elle serait aussi impliquée dans la réparation de l'ADN, et l'export nucléaire de P53 (Hicke, 1999; Hicke, 2001).

Siah possèderait cette double potentialité de mono- ou poly-ubiquitiner ses protéines cibles. En effet hSiah-2 est capable d'induire *in vitro* à la fois la mono et la poly-ubiquitination de la Synphilin-1 (Liani et al., 2004).

III.3.4 - Siah et la dégradation par la voie du protéasome

L'activité E3-ligase de Sina a été montrée par Carthew & Rubin et par Lorick en 1999 (Carthew and Rubin, 1990; Lorick et al., 1999).

Conaway *et al.* dans une revue sur l'Ubiquitine (Conaway et al., 2002) soulèvent l'originalité de Siah par rapport au modèle classique de SCF-E3 ligase où la fonction E3 ligase est généralement due à un complexe protéique. Les protéines de la famille Siah peuvent suivre ce modèle de type SCF et agir en tant que partie d'un complexe E3 ligase (Li et al., 1997; Tang et al., 1997; Liu et al., 2001; Matsuzawa and Reed, 2001; Li et al., 2002), mais elles peuvent aussi agir seules en tant que E3 ligase (Habelhah et al., 2002).

Plusieurs équipes ont montré l'importance du domaine RING pour la dégradation des cibles de Siah par le protéasome, soulignant ainsi que le domaine RING est indispensable à l'activité E3 ligase de Siah (Hu and Fearon, 1999).

Sina/Siah peut lier les enzymes de type E2 UbcH9 (Hu et al., 1997),UbcH8 (Wheeler et al., 2002) et UbcH5 (Matsuzawa and Reed, 2001) par leur domaine RING contenu dans leur partie N-terminale. Chez les plantes aussi, Sinat5 est capable de lier un homologue de UbcH5 et l'Ubiquitine (Xie et al., 2002).

Siah, en induisant l'ubiquitination de certaines protéines, les conduit vers la voie de dégradation. Siah-1 interagit avec APC une protéine majeure de la voie de dégradation (Liu et al., 2001).

Siah induit la dégradation de nombreuses protéines ; entre autres la β-caténine, c-myb, BOB.1/OBF.1, N-CoR, DCC, TIEG-1, TRAF2, Numb, Bag-1, Kid et la Synaptophysine (Tableau 2 page 60).

Les protéines Siah sont elles-mêmes ubiquitinées et dégradées par la voie du protéasome. La surexpression du domaine UBAb de liaison de l'Ubiquitine ligase Cbl-b aux Ubiquitines inhibe la dégradation de hSiah-1 sans affecter sa poly-ubiquitination (Davies et al., 2004).

Si la majorité des ligands de Siah sont dirigés vers le protéasome, certaines protéines interagissant avec Siah ne sont ni ubiquitinées ni dégradées (voir Tableau 2 page 60). De plus Siah cible des protéines aux fonctions tellement variées qu'elle a besoin d'être finement régulée pour avoir une action cohérente avec les besoins de la cellule.

III.4 - La régulation de l'expression de Siah

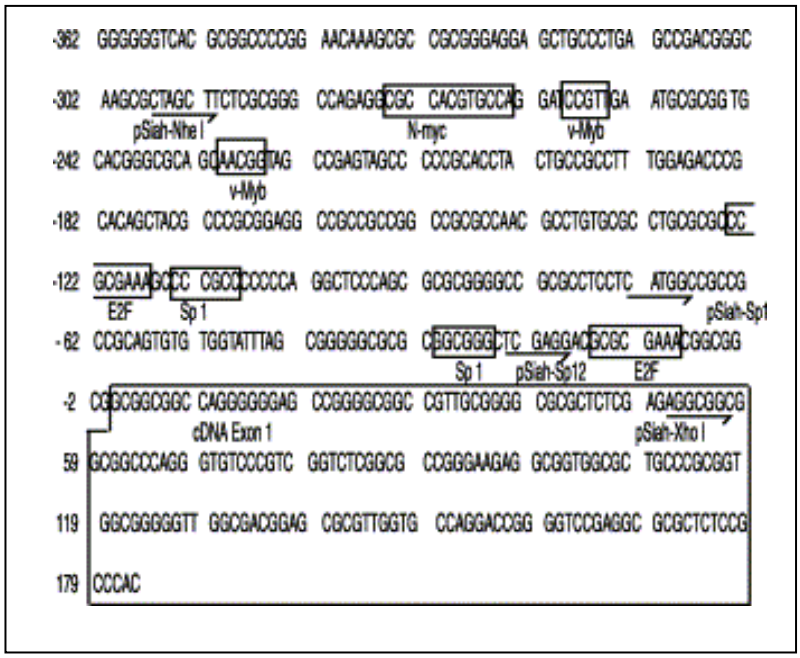
III.4.1 - La régulation transcriptionnelle

III.4.1.1 - Généralités

Après avoir cloné 3,5kb de la région promotrice du gène *hsiah-1*, une équipe japonaise a entrepris d'étudier la régulation de son expression (Maeda et al., 2002). C'est tout d'abord une analyse informatique qui a permis d'identifier un grand nombre de sites de liaison potentiels de différents facteurs de transcription impliqués dans la différentiation et la régulation du cycle cellulaire tels GATA-1, v-Myb, E2F… aucun site de type TATA ou CCAAT box n'a pu être identifié dans cette région. Par contre elle comprend trois sites de liaison à Sp1.

De plus 2 séquences consensus incomplètes de liaison de la p53 ont été mises en évidence.

Une activité promotrice basale a été localisée en –297/+50, tandis qu'un site de répression serait présent en –923/-298.



D'après(Maeda et al., 2002)

***Figure 12 : Le promoteur du gène* hsiah-1**

Une analyse du profil d'expression d'un grand nombre de gènes montre que *siah-1* et *siah-2* ne présentent pas un profil d'expression typique des gènes régulés par le cycle cellulaire (Whitfield et al., 2002).

La régulation transcriptionnelle de *siah-2* n'a à ce jour pas été étudiée.

La régulation transcriptionnelle par P53 fera l'objet d'un chapitre ultérieur (page 66).

III.4.1.2 - Une régulation par épissage alternatif ?

III.4.1.2.1 - Chez l'humain

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ARNm *hsiah-1* est présent sous 2 formes qui résultent de la présence de 2 ATG dans sa séquence. Les 2 ARNm coderaient pour des protéines ayant des activités sensiblement différentes (Iwai et al., 2004).

III.4.1.2.2 - Chez la souris

.III.4.1.2.2.1 Des résultats difficilement interprétables

C'est l'équipe de Bowtell qui a été la première à cloner les ADNc codant pour les homologues murins de *sina* (Della et al., 1993). Outre quelques différences dans leur séquence codante, les ADNc de *siah-1a* et *siah-1b* qui ont été clonés présentent chacun une longueur différente: 1,9 et 1,7 kb respectivement.

Cette équipe a également mis en évidence la présence de deux bandes en *Northern blots* sur des ARN de souris hybridés avec une sonde *siah-1* (reconnaissant à la fois *siah-1a* et

siah-1b). Ils ont estimé que ces deux bandes correspondaient à 2 isoformes de l'ARNm *siah-1a* résultant d'une différence de polyadénylation, et non pas à *siah-1a* et *siah-1b*.

Afin de valider cette affirmation, Bowtell et ses collaborateurs (Dickins et al., 2002) ont examiné l'expression des ARNm *siah-1* dans les testicules de souris sauvages, hétérozygotes et KO pour *siah-1a*. La sonde reconnaissant à la fois *siah-1a* et *siah-1b* révèle deux bandes dont l'intensité diminue dans les hétérozygotes et disparaît totalement dans les souris KO *siah-1a*. Ils confirment ainsi que la sonde ne détecte bien que deux isoformes de *siah-1a*.

Comme la plupart des gènes présents sur le chromosome X, *siah-1b* n'est pas exprimé durant la méiose des cellules germinales mâles (Heard and Avner, 2000). On ne peut donc pas détecter en *Northern blot* dans ces tissus (testicules) de bande correspondant à *siah-1b*.

On ne peut donc pas exclure que, dans d'autres tissus, les deux bandes observées en Northern Blot avec cette sonde ne contiennent pas en partie du *siah-1b*.

Dans un autre article (Frew et al., 2002), l'équipe de Bowtell affirme que les deux bandes observées sur des *Northern blot* (hybridés avec une sonde reconnaissant toujours à la fois *siah-1a* et *siah-1b*) représentent trois formes d'ARNm *siah-1*. La bande haute contiendrait, selon eux, *siah-1b* plus la forme longue de *siah-1a*, alors que la bande basse correspondrait à la forme courte de l'ARNm *siah-1a*.

De plus, la taille des ADNc clonés par cette même équipe ne correspond pas aux tailles qu'ils observent en *Northern blot*.

Un consortium réalisant du séquençage à haut débit a également cloné les ADNc codant pour les protéines Siah-1a et Siah-1b (Strausberg et al., 2002). Si la séquence de *siah-1b* a été confirmée, celle de *siah-1a* présente des différences en 5' par rapport à celle publiée par Della et coll..

	Della et al.		**Consortium**	
siah-1a	NM_009172	1968 bp		
siah-1b	NM_009173	1713 bp	BC052887	1720 bp

.III.4.1.2.2.2 Un début d'explication

Dans le but de caractériser les bandes observées en Northern blot, nous avons réalisé différentes expériences de RACE-PCR.

Nous obtenons pour *siah-1b* des clones pour lesquels la séquence en 3' de est identique à celle publiée par l'équipe de Bowtell et le consortium.

Nous avons pu cloner en 5' de l'ADNc différents fragments contenant le premier exon de l'ARNm *siah-1a*. J'ai pu identifier :

- 15 % de clones contenant l'exon décrit par Della et al.
- 15 % de clones contenant l'exon décrit par le consortium

- 70 % des clones contenant un premier exon différant des deux précédents et qui n'avais encore jamais été décrit (AY495086)

Cet exon comporte au moins 231 pb, ce qui conduit à un ADNc entier d'au moins 1900 pb pour *siah-1a.*

Les RACE PCR ne nous ont pas permis pour l'instant d'obtenir des données sur les extrémités 5' de *msiah-1b* ni 3' de *msiah-1a*.

Ces expériences ont révélé qu'il existe bien plusieurs isoformes d'ADNc *siah-1a* présentant différentes tailles. Il conviendrait de poursuivre le clonage en 5' de *siah-1b* et en 3' de *siah-1a* pour déterminer les tailles et séquences exactes des ARNm. Nous pourrions alors identifier clairement les bandes observées en Northern blot.

Nous envisageons également de déterminer la raison de l'existence d'un épissage alternatif en 5' de *msiah-1a*, et de savoir s'il est spécifique à certains tissus, certains stades...

III.4.2 - La régulation post-transcriptionnelle

III.4.2.1 - Au niveau ARNm

Le complexe Nanos-Pumilio est un répresseur de la traduction impliqué dans la morphogenèse et le développement des cellules germinales chez la drosophile. Un complexe homologue (Nanos1-Pumilio2) contenant aussi un motif de liaison à l'ARN a été identifié chez l'humain. Une recherche informatique des ARNm présentant une séquence 3' non codante semblable à celle présente dans les cibles connues du complexe chez la drosophile a permis d'identifier *hsiah-1* comme une cible potentielle de Nanos1-Pumilio2. Il a ensuite été montré qu'à la fois Nanos1 et Pumilio2 sont capables de lier la région 3' non codante de l'ARNm *hsiah-1* (Spik A, 2003). Cette liaison pourrait jouer sur la stabilité de l'ARNm et ainsi réguler le niveau de la protéine.

III.4.2.2 - La dégradation de la protéine

Comme nous l'avons évoqué plus haut, Siah est une protéine dont la fonction majeure est d'induire la dégradation d'autres protéines par le protéasome. Pourtant Siah est elle même ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Hu and Fearon, 1999; Lorick et al., 1999). Son niveau basal est ainsi maintenu très bas, de sorte qu'il est très difficile de détecter la protéine endogène dans des cellules ou des tissus.

La délétion du domaine RING semble empêcher la propre dégradation de Siah par le protéasome sans que son niveau de transcription soit affecté (Hu and Fearon, 1999).

En présence de Disabled-1, un adaptateur cytosolique essentiel au développement du système nerveux central, l'ubiquitination et l'activité E3 ligase de Siah-1a sont diminuées (Park et al., 2003), ce qui conduit à une augmentation de son expression puisqu'elle est moins "auto-ubiquitinée".

III.4.3 - Une expression différentielle

III.4.3.1 - Localisation intracellulaire

Bien que Sina ait initialement été décrite comme une protéine nucléaire les protéines Siah sont aujourd'hui considérées comme des protéines cytoplasmiques qui présentent une répartition intracytoplasmique (Hu et al., 1997; Hu et al., 1997) ponctiforme, et, pour certaines, semblable à celle des endosomes précoces des cellules PC12 (Wheeler et al., 2002).

La délétion de la partie C-terminale ou du domaine RING de Siah-1 entraîne une perte de spécificité de la localisation de la protéine (Hu and Fearon, 1999; Germani et al., 2003).

III.4.3.2 - Distribution tissulaire

Comme nous le verrons plus loin, la détection des protéines Siah endogènes est très difficile du fait de leur dégradation permanente. L'expression des gènes est donc plutôt quantifiée au niveau de leur transcription.

Les ARNm *hsiah-1* et *hsiah-2* sont exprimés à de faibles niveaux mais de façon uniforme dans la plupart des tissus adultes (Adams et al., 1995). Chez la souris, *siah-1a*, *siah-1b* et *siah-2* sont largement exprimés à de faibles niveaux chez l'embryon et l'adulte (Della et al., 1993).

III.4.3.2.1 - Siah-1

L'ARNm codant pour hSiah-1 a initialement été trouvé dans un grand nombre de tissus (Su et al., 2002), incluant le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie et les muscles squelettiques (Nemani et al., 1996; Matsuo et al., 2003; Nagano et al., 2003).

Il faut noter que nous avons trouvé dans le placenta 2 formes de l'ARNm *hsiah-1* résultant probablement d'un épissage alternatif spécifique à ce tissu (Nemani et al., 1996).

Hsiah-1 est beaucoup plus exprimé dans les cellules pré-B que dans les cellules souches hématopoïétiques (Muschen et al., 2002). L'expression de *hsiah-1* est réduite 2,7 fois dans des cellules-B CD38+ comparées aux cellules CD38- (Boehm et al., 2001).

Msiah-1a est exprimé dans de nombreux tissus, avec une intensité particulièrement haute dans le cerveau, et une plus moyenne dans les poumons, les testicules et le thymus (Della et al., 1993). On le trouve aussi exprimé dans les embryons en pré implantation (Stanton and Green, 2001).

Msiah-1b est enrichi dans la fraction des cellules endothéliales durant le développement vasculaire et l'angiogénèse au niveau des poumons (Favre et al., 2003). Etant localisé sur le chromosome X, le gène *siah-1b* n'est pas exprimé durant la méïose des cellules germinales mâles.

Les cellules particulières de l'hypocampe et du cerrebellum que sont les neurones pyramidaux et les cellules de Purkinje, qui expriment fortement les récepteurs au glutamate, expriment aussi très fortement l'ARNm *msiah-1* (Moriyoshi et al., 2004).

Siah-1a est induit suite à la translocation chromosomique aboutissant à la protéine de fusion MLL-CBP (Wang et al., 2005).

L'expression de l'ARNm codant pour Siah-1 varie au cours du développement des bourses de Fabricius chez le poulet (Neiman et al., 2001).

III.4.3.2.2 - *Siah-2*

L'expression des ARNm *hsiah-2* au niveau ARNm varie fortement au cours de la différenciation de cellules myocytaires cardiaques *in vitro* (Peng et al., 2002).

h*siah-2* est diminué en présence de FGF2 dans les cellules endothéliales (Takahashi et al., 2005).

L'analyse par micropuce à ADN de l'expression de *hsiah-2* dans différentes cellules lymphocytaires a pu mettre en évidence de grandes diversités d'expression. S*iah-2* est exprimé dans le centre germinal des cellules B et dans les cellules B activées in vitro (Alizadeh et al., 2000).

Siah-2 est exprimé dans les testicules au niveau des spermatides post méïotiques, c'est à dire à un stade de développement comparable à celui des cellules germinales femelles où l'on commence à observer ce même ARNm.

Adams et al ont identifié un homologue de *sina* exprimé dans le cerveau humain. Cet homologue serait *hsiah-2* (Adams et al., 1992; Della et al., 1993).

Msiah-2 semble ubiquitaire mais est plus fortement exprimé au niveau de l'épithélium olfactif, de la rétine, du cartilage en prolifération et des cellules germinales (Della et al., 1993). L'ARNm *msiah-2* est très abondant dans les cellules du système nerveux central qui présentent 2 isoformes de *siah*. De même, des cellules de neuroblastome N18 présentent ces 2 isoformes alors que des cellules 293T n'en possèdent qu'une (Zhang et al., 1998).

L'ARNm codant pour mSiah-2 est présent dans les ovules non fertilisés et au stade 2 cellules de l'embryon (Della et al., 1995; Ko et al., 2000).

III.4.3.3 - *Une expression modifiée biologiquement*

Un grand nombre de molécules sont connues pour influencer l'expression des protéines et ARNm *siah*.

Les gènes *siah* semblent exprimés dans toutes les populations des cellules hématopoïétiques (cellules progénitrices ou matures) (Bowtell et al. *unpublished*). Toutefois le niveau d'expression des 3 gènes *siah* murins semble varier au cours de la maturation des lymphocytes B (Hoffmann et al., 2002).

Hsiah-2 est induit par un traitement à l'œstradiol (Frasor et al., 2004), par Wnt-5a dans les cellules 293 (Topol et al., 2003), et rapidement par TRAIL, un membre de la famille du TNFα capable d'induire la mort de cellules tumorales (Kumar-Sinha et al., 2002). *Hsiah-2* est induit dans des cellules traitées par la drogue AP20187 (Lu et al., 2004) qui induit la dimérisation et l'activation de protéines de fusion contenant un domaine récepteur aux facteurs de croissance, ici une kinase EIF2 artificielle. Siah-2 est donc un maillon de la cascade d'activation induite par un stress et passant par eIF2. Siah-2 est aussi induite lors d'un stress hypoxique (Nakayama and Ronai, 2004).

Au contraire, l'expression de *hsiah-2* est légèrement diminuée dans des cellules traitées par le TGFβ1 (Perou et al., 1999). Des études ont montré que des souris KO pour CDK4 n'expriment plus *siah-2* au niveau des testicules (Rane et al., 1999).

La surexpression de P21/Waf1/Cip1 entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour Siah-1 (Linares-Cruz et al., 1998).

Hsiah-1 est réprimé au niveau transcriptionnel lors d'une stimulation par le sérum (Iyer et al., 1999).

En étudiant le profil d'expression de gènes référence, Laegreid et col. ont classé différents gènes en fonction de leur variation d'expression. Ainsi *siah-1* a été prédit comme intervenant dans le métabolisme des lipides et la transcription (Lagreid et al., 2003).

Siah-1b est surexprimé dans les cellules traitées par de l'insuline et du glucose mais pas par l'IGF1 (Dupont et al., 2001; Ohsugi et al., 2005).

Il a été montré qu'un régime hypocalorique affectait l'expression de *siah-1a* (Lee et al., 2002).

III.4.3.4 - Une expression modifiée chimiquement

L'expression de *siah-1a* diffère entre un cerveau normal et un autre traité à la métamphétamine (Brown et al., 2002).

Hsiah-1 est induit 7,69 fois en réponse au chrome (Ye and Shi, 2001).

La quantité intracellulaire du complexe APC/Siah-1 augmente de 2 à 3 fois dans les cellules traitées au lithium (Olmeda et al., 2003).

Les cellules traitées avec la tunicamycine subissent un stress au niveau de leur réticulum endoplasmique. Des cellules HT-22 (sous clone des HT-4) traitées avec cet agent surexpriment Siah-2 (Lu et al., 2004). Cette augmentation de l'expression de Siah-2 serait entre autres médiée par l'activation du facteur initiateur de la traduction eIF2α. Mais le rôle de Siah dans ce type de phénomène physiologique n'est pas encore compris.

III.5 - Au niveau de l'organisme : implication des protéines Siah dans le développement

Les drosophiles mutées sur le gène *sina* sont léthargiques et présentent des mouvements non coordonnés (Carthew and Rubin, 1990). Aucune explication de l'apparition de ces phénotypes n'a été avancée pour le moment.

Comme nous l'avons vu plus haut (III.1.1 - page 33), Sina est capable d'induire la dégradation du répresseur de transcription Tramtrack et ainsi permettre le développement du photorécepteur R7 (Li et al., 1997; Tang et al., 1997).

Dans le but d'approfondir la compréhension des fonctions de Siah, des souris KO pour chacun des gènes murins ont été générés par l'équipe de Bowtell. Elles présentent toutes des phénotypes différents, ce qui indique qu'elles ont chacune des activités propres. Ces phénotypes montrent que les protéines Siah agissent à différents stades du développement.

III.5.1 - Rôle majeur des protéines Siah dans l'embryogénèse

Les souris KO pour *siah-1b* présentent de lourds défauts au stade embryonnaire et la plupart des fœtus dégénèrent (Frew et al., 2002). Ceci implique un rôle majeur de Siah-1b au cours du développement embryonnaire.

Siah-1a pourrait être impliquée dans la formation de la cavité embryonnaire (Maekawa et al., 2005).

hSiah-1 dégrade Numb (Susini et al., 2001) une protéine majeure du développement de la drosophile. Elle est associée à la membrane et se localise asymétriquement lors du développement des organes sensoriels. Numb bloque la voie Notch qui active la transcription de différents gènes essentiels à l'embryogénèse. La quantité de Numb/Notch régule la balance entre prolifération et différenciation.

Des embryons de Xénope auxquels on a injecté l'ARNm codant pour hSiah-1 présentent une forte ventralisation et une dorsalisation réduite comme l'indique l'index dorso-antérieur (Liu et al., 2001). Cet effet serait notamment dû à une dégradation accrue de la β-caténine.

Il a récemment été montré que Siahz interagit avec Sinup, une nouvelle protéine impliquée à différents stades du développement embryonnaire (Ro et al., 2005).

III.5.2 - Effet de Siah-1a sur la croissance

Le KO partiel (il reste les 22 premiers acides aminés) du gène *siah-1a* a entraîné l'apparition de plusieurs phénotypes.

Si jusqu'à 18 jours de développement embryonnaire il n'a pas été trouvé de différence de croissance entre les souris sauvages et les souris KO, dès 24h après la naissance, une différence significative de poids est observée. Cette différence augmente avec l'âge et une souris mutante adulte ne pèse que 60% du poids d'une souris normale (Dickins et al., 2002).

La baisse de poids a d'une façon générale touché tous les organes de la même façon, hormis les testicules et le foie qui étaient, proportionnellement au reste du corps, plus petits et les poumons et le cerveau qui étaient proportionnellement plus gros que dans des souris sauvages.

Cette anomalie de croissance n'est pas due à un effet de Siah-1a sur la croissance cellulaire en générale car des MEFs provenant de souris KO poussent et meurent de la même façon que des souris sauvages.

Il faut aussi noter que les souris *siah-1a* KO présentent une forte mortalité.

L'analyse des double mutants *siah-1a/siah-2* (Frew et al., 2003) a montré une augmentation de la mortalité des souris dans les premières heures après naissance pour une raison indéterminée car ces doubles mutants sont physiologiquement et histologiquement identiques aux mutants siah-1a. Le développement et tous les organes des souris KO uniquement pour siah-2 sont normaux. Siah-1a et Siah-2 ont donc des activités redondantes.

III.5.3 - Implication dans le développement neuronal

III.5.3.1 - La formation des yeux

La surexpression de hSiah-1 dans les embryons de Xénope induit entre autre une perte du développement des yeux (Liu et al., 2001).

Xsiah-2 est un ARNm présent dans l'ovocyte non fécondé et est impliqué dans le développement de l'œil et du cerveau de Xénope (Bogdan et al., 2001). La surexpression de Siah-2 induit une réduction de la taille de l'œil (Della et al., 1995).

III.5.3.2 - Les récepteurs à la Nétrine

La structure et la séquence de DCC et de la Néogénine sont similaires. Toutes deux font partie de la famille des récepteurs à la Netrine (Keino-Masu et al., 1996), une protéine importante pour le guidage des neurones et la migration cellulaire pendant le développement neuronal (Chan et al., 1996; Kolodziej et al., 1996; Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997).

La Néogénine est capable de lier Siah-1b (Cooper, 2002), tandis que les protéines Sina/Siah induisent l'ubiquitination et la dégradation de DCC par le protéasome (Hu et al., 1997).

III.5.4 - Implication dans la formation des os

Des études plus poussées sur les souris mutantes pour *siah-1a* ont révélé des phénotypes particuliers : elles présentent un grand nombre d'ostéoclastes et un faible nombre d'ostéoblastes ce qui induit une ostéopénie sévère (Frew et al., 2004). Ce phénotype n'est pas dû à un problème de différenciation ou de prolifération cellulaire. De plus l'augmentation du nombre d'ostéoclastes n'est pas issu d'une variation du nombre de progéniteurs car les souris mutantes en contiennent autant que les contrôles.

Les souris mutantes présentent une réduction du volume de l'ostéoïde. Ceci peut s'expliquer par une forte capacité des ostéoblastes mutants à induire la minéralisation.

Des études de greffe de moelle osseuse ont montré que les anomalies osseuses des souris mutantes pour *siah-1a* ne viennent pas des cellules en elles mêmes mais plus vraisemblablement de facteurs (circulants ou cellulaires) environnants. La concentration calcique dans le sérum n'est pas affectée dans les mutants.

Lors de la différentiation et de l'activation des ostéoclastes, il y a activation de récepteurs qui transduisent leur activation par les protéines TRAF (*TNF receptor associated factor*). Or Siah-1 présente des homologies structurales avec les protéines TRAF, et Siah-1a est impliquée dans la transduction du signal de TNFα par TRAF2 (Polekhina et al., 2002). En outre, Siah-1a induit la dégradation de TIEG-1 (TGFβ-inducible early growth response), une protéine sous le contrôle de facteurs de prolifération et de différentiation des ostéoblastes et ostéoclastes (Johnsen et al., 2002). Il faut aussi noter que la β-caténine, une autre cible de Siah-1a, a été impliquée dans la voie d'activation de la prolifération des ostéoblastes et de formation de la matrice osseuse (Kato et al., 2002).

III.5.5 - Implication dans l'hématopoïèse

En l'absence de Siah-2 il n'a pas été noté de problème au niveau du thymus de la rate ou des ganglions lymphatiques. Mais les KO *siah-2* ont une moëlle osseuse contenant un compartiment de progéniteur myéloïde étendu sans qu'un type particulier de cellules myéloïdes soit favorisé. La perte de Siah-2 n'altère pas la prolifération des lymphocytes B en réponse aux agents mitogènes (Frew et al., 2003). La perte combinée de Siah-1a et Siah-2 n'affecte pas l'hématopoïèse normale des souris.

Les mutants *siah-1a* générés par l'équipe de Bowtell présentent un déficit en globules blancs : les souris -/- contiennent 50 à 70 % moins de globules blancs que des souris contrôle au niveau de la rate, du thymus, des ganglions lymphatiques et de la moëlle osseuse (Frew et al., 2004).

La diminution du nombre total de cellules n'est pas due à la diminution d'un type cellulaire en particulier, mais de tous les types cellulaires de la lignée blanche. Toutefois des études *in vitro* montrent que Siah-1a n'est pas indispensable à la prolifération des cellules hématopoïétiques. De plus l'augmentation du nombre d'ostéoclastes n'est pas dû à une variation du nombre de progéniteurs car les souris mutantes en contiennent autant que les contrôles.

III.5.6 - Une activité au niveau des organes sexuels

Les mutants pour *siah-1a* sont stériles pour des raisons que nous allons développer ci-dessous (voir page 54).

Les souris KO pour *siah-2* sont fertiles.

Les drosophiles mutées sur le gène *sina* sont stériles bien qu'elles ne présentent pas d'anomalies au niveau de leurs gamètes (Carthew and Rubin, 1990).

III.6 - Au niveau cellulaire : le rôle de Siah dans la prolifération et l'apoptose

III.6.1 - Siah et le cycle cellulaire

III.6.1.1 - Généralités

Différentes équipes ont montré l'implication des protéines Siah dans le cycle cellulaire. D'ailleurs, il a été montré que le niveau d'expression de *siah-1* varie au cours du cycle cellulaire (Frew et al., 2002). Il est notamment régulé positivement par deux protéines majeures de la progression dans le cycle cellulaire : P53 et P21/Waf1/Cip1 (Amson et al., 1996; Linares-Cruz et al., 1998; Roperch et al., 1999; Liu et al., 2001). A l'opposé, des études ont montré que P21/Waf1/Cip1, une protéine majeure du cycle cellulaire est plus exprimée dans les cellules surexprimant Siah-1 que dans les cellules contrôles (Nemani et al., 1996; Germani et al., 2003).

En accord avec le rôle de Siah-1 dans l'arrêt de croissance, la stimulation par le sérum de fibroblastes humains induit une forte répression de *siah-1* au niveau transcriptionnel. La cinétique de répression de *siah-1* est comparable à celle de gènes impliqués dans le cycle de division cellulaire (Iyer et al., 1999).

De plus, en surexprimant Siah-1 dans certaines lignées, on observe une diminution de la croissance cellulaire (Matsuzawa et al., 1998; Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999). De même chez le poisson, Siaz induit l'arrêt de croissance en inhibant la transition G2/M (Ro et al., 2004).

Siah-1 et Siah-2 induisent la dégradation de CtIP (*CTBP-interacting protein*) par le protéasome (Germani et al., 2003). CtIP est une protéine qui inactive *brca1* (Li et al., 2000) le gène suppresseur de tumeur impliqué dans le mécanisme de réparation de l'ADN, la croissance cellulaire, la régulation transcriptionnelle… En dégradant CtIP, Siah libère BRCA1 qui peut alors transactiver les gènes majeurs du cycle cellulaire : *p21/waf1/cip1*, *gadd45*, *tbp* ou le facteur de transcription *tfIIB* (*transcription factor II B*).

Siah régule la dégradation de la protéine oncosuppressive Numb (Susini et al., 2001) dont la surexpression inhibe la prolifération cellulaire.

III.6.1.2 - La mitose

Outre un ralentissement de croissance, il a été observé dans les cellules surexprimant Siah-1 de nombreuses anomalies au niveau de la mitose conduisant à l'apparition de cellules

de grande taille et dans plus de 50% des cas plurinucléées. Ces cellules résultent d'une mitose incomplète où la division nucléaire n'est pas suivie d'une cytokinèse (Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999).

La tubuline, élément majeur du cytosquelette, et dont la régulation fine permet entre autres le bon déroulement de la mitose, est affectée par une surexpression de Siah-1. Le fuseau mitotique est notamment fortement perturbé dans certaines cellules transfectées, et un nombre anormal de centrosomes est observé dans les cellules plurinucléées en particulier. L'α-tubuline est un ligand de Siah-1 (Germani et al., 2000).

III.6.1.2.1 - La protéine Kid

Siah-1 induit l'ubiquitination et la dégradation de Kid (Germani et al., 2000), une chromokinésine permettant de détacher les chromosomes du fuseau en fin de mitose. La partie N-terminale de Kid lie les microtubules alors que la partie C-terminale est capable de lier l'ADN.

Kid est l'homologue humain du gène *nod* chez la drosophile qui est aussi connu pour son importance dans l'alignement des chromosomes le long de la plaque métaphasique (Zhang and Hawley, 1990; Zhang et al., 1990; Afshar et al., 1995; Afshar et al., 1995) tout comme son homologue *xkid* chez le xénope (Antonio et al., 2000).Pour cette raison l'anaphase ne peut débuter sans qu'au préalable Kid n'ait été dégradée par *l'Anaphase Promoting Complex* (APC) et le protéasome, sauf chez l'humain où l'on trouve encore Kid au niveau des centromères anaphasiques (Tokai et al., 1996).

La dégradation de Kid par Siah-1 a été observée chez l'humain, mais pas chez le xénope (résultats non publiés de l'équipe de Lorca). Il faut noter que Kid peut être dégradée par APC et que Siah-1 interagit avec APC.

L'altération de la mitose provoquée par la surexpression de Siah-1 pourrait donc passer par Kid.

III.6.1.2.2 - La protéine Bag-1 (Bcl-2-associated athanogene)

Siah-1a interagit avec l'isoforme S de Bag-1 (Matsuzawa et al., 1998; Luders et al., 2000). Bag-1 a été découverte comme interagissant avec Bcl-2 et favorisant la survie cellulaire (Takayama et al., 1995), mais aussi avec de nombreuses autres protéines dont elle régule l'activité notamment à travers son action sur les protéines de choc thermique (Hohfeld et al., 2001; Gehring, 2004). La surexpression de Bag-1 induit une activation de la transcription et protège les cellules d'une apoptose induite par un choc thermique.

Bag-1 contient un domaine similaire à l'Ubiquitine dont le rôle n'est toujours pas élucidé bien que l'on sache qu'il peut interagir avec le protéasome.

Si l'interaction entre les 2 protéines est connue depuis longtemps, son rôle fonctionnel n'a toujours pas été élucidé. On sait juste que la surexpression de Siah-1a seule induit l'arrêt des cellules en phase G0/G1 et G2/M, et une diminution du nombre de cellules en phase S (Matsuzawa et al., 1998). Or, si Bag-1 est surexprimée en même temps, cet effet est réversé.

III.6.1.2.3 - La protéine Siah-BPI (Siah Binding Protein I)

Lors de travaux n'ayant pas fait l'objet d'une publication, l'équipe de Bowtell a réalisé un criblage en double hybride de levure afin d'identifier des partenaires de Sina et Siah. Ils ont entre autres isolé un ADNc codant pour une protéine interagissant avec Siah et jusqu'alors inconnue qu'ils ont nommé SiahBPI pour *Siah Binding Protein I* (séquence codante partielle NCBI Acc.N. U51586). Depuis, cette protéine a également été nommée *pyrimidine-tract binding splicing factor*, *poly-U binding splicing factor* PUF60 et RoBPI. RoBPI résulterait en fait d'un épissage alternatif de l'ARNm *siahBPI*.

En 1999 une autre équipe a encore renommé la protéine fuse-binding protein-interacting repressor (FBP-IR soit FIR) (Page-McCaw et al., 1999). FBP et FIR sont des facteurs affectant la transcription de *myc*. Le proto-oncogène m*yc* code pour un facteur de transcription impliqué notamment dans la croissance cellulaire et la prolifération.

L'effet inhibiteur de Siah-BPI sur l'expression de Myc est un mécanisme potentiellement important de la mitose. Il faut maintenant connaître l'influence de Siah sur SiahBPI.

III.6.1.3 - La méïose

Les souris KO pour *siah-1a* sont stériles (Dickins et al., 2002), ont des testicules petits proportionnellement au reste du corps mais produisent un taux normal des différentes hormones sexuelles (testostérone, FSH et LH). Si certaines femelles KO ont pu produire des souriceaux (mais qui ne vivaient qu'un seul jour), les mâles sont totalement stériles.

Ce n'est pas le seul cas où l'on montre qu'un défaut d'ubiquitination entraîne des problèmes de spermatogénèse (Berruti and Martegani, 2005).

Les souris mâles présentent d'importantes perturbations des testicules au niveau du tube séminifère, très peu de cellules dépassent le stade de la méïose I ce qui entraîne l'absence de spermatides . Si la prophase I semble normale, la métaphase I et surtout l'anaphase I semblent les stades les plus touchés par la délétion du gène *siah-1a*.

Plusieurs phénomènes semblent empêcher l'aboutissement de la méiose I : une dégénération des cellules en métaphase et anaphase I, une mauvaise ségrégation des chromosomes et une cytokinèse défaillante entraînant toutes deux l'apparition de cellules multinucléées.

Les travaux menés jusqu'alors par l'équipe de Bowtell n'ont pas permis de comprendre par quel mécanisme l'absence de Siah-1a bloque les spermatocytes en métaphase I.

On peut penser que dans des souris sauvages, Siah-1a entraîne la dégradation d'une ou plusieurs protéine(s) impliquée(s) dans la transition de la métaphase à l'anaphase. L'hypothèse de l'implication de la protéine Kid (voir plus haut) a été avancée mais n'est toujours pas résolue.

Il faut noter que le gène *siah-1b* est localisé sur le chromosome X qui est soumis à une répression transcriptionnelle durant la méïose dans les cellules germinales mâles (Heard and Avner, 2000). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'absence de Siah-1a entraîne des effets au niveau de la méïose et pas au niveau de la mitose où Siah-1b pourrait palier à son absence.

T-STAR/Salp/SLM-2/KHDRBS3 est une cible de Siah-1 (Hyslop et al., 2004; Venables et al., 2004) et est dégradée par le protéasome 26S.

T-Star est exprimée dans les testicules et semble régulée lors de la méïose des cellules germinales de rat. Elle est capable de lier et vraisemblablement de réguler l'activité de RBM, une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la spermatogenèse.

III.6.2 - Siah et l'apoptose

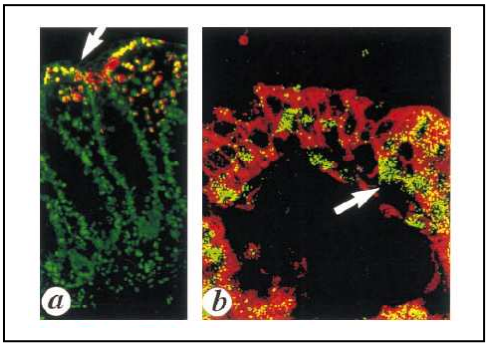
III.6.2.1 - Généralités

L'apoptose conduit à la mort des cellules en fin de vie, des cellules inutiles, et des cellules qui présentent des anomalies irréparables. Ce mécanisme est primordial dans le développement puisqu'il permet l'organogénèse (ex : élimine la palmature des phalanges), de sélectionner les cellules immunitaires pour qu'elles reconnaissent le non-soi, …

Ce phénomène passe par l'activation de protéines particulières : les caspases. Une fois activées elles induisent une cascade de clivage de protéines essentielles à la vie cellulaire, ce qui aboutit au suicide des cellules. L'apoptose est souvent dérégulée dans les cancers, de sorte que les cellules qui devraient être éliminées, au contraire prolifèrent.

Notre équipe a montré par *cDNA differential display* que *siah-1b* est un gène induit lors de l'apoptose initiée par le gène suppresseur de tumeur *p53* dans le système inductible LTR6 (Amson et al., 1996) (voir II.5.4.3 - page 23). Des études par *Northern blot* ont confirmé ce résultat.

De plus dans des cellules U937 et dans les cellules d'hépatome, la surexpression du seul gène *siah-1* peut induire la mort cellulaire programmée (Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999; Roperch et al., 1999; Okabe et al., 2003). En outre, l'expression de hSiah-1 dans les cellules de l'épithélium intestinal est beaucoup plus forte au niveau des cellules des villosités qui sont entrées en apoptose qu'au niveau des cellules basales en division (Nemani et al., 1996).



a : coupe longitudinale où l'ADN est marqué en vert et les cellules apoptotiques en jaune.
b : coupe de l'apex des villi où l'ARNm siah-1 est marqué en vert.

Figure 13 : Expression de* siah-1 *dans les cellules intestinales en apoptose à l'extrémité des villi

Il a récemment été montré que les 3 gènes murins sont surexprimés dans un modèle d'induction d'apoptose par rapport à des cellules normales (Desagher et al., 2005).

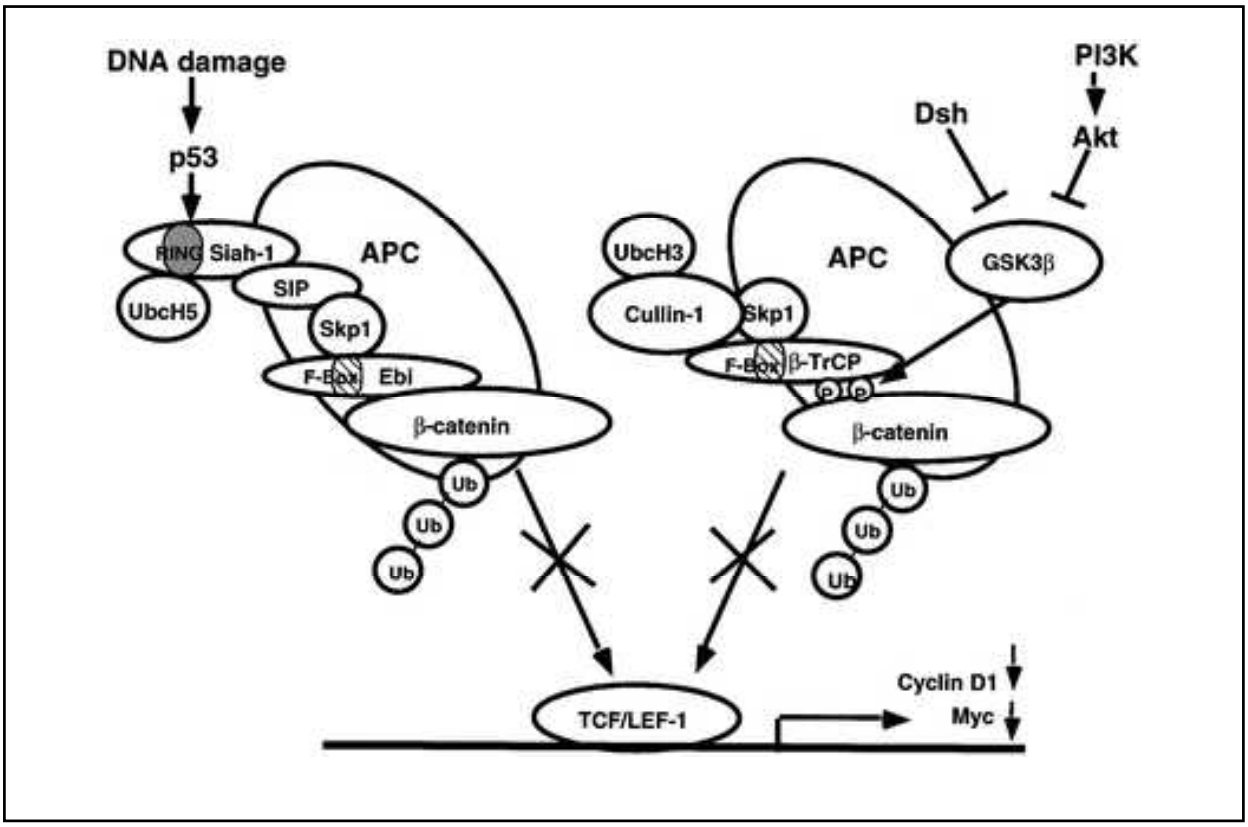
En accord avec ces données, la diminution de l'expression de Siah-1 par stratégie antisens induit une diminution de l'apoptose induite par P53 (Susini et al., 2001).

Toutefois des effets en contradiction avec l'effet pro apoptotique de Siah ont été obtenus dans des cellules leucémiques : les cellules résistantes à l'apoptose induite par des oligonucléotides CpG surexpriment hSiah-1 par rapport aux cellules sensibles (Tidd et al., 2003). Cette apoptose induite ne requiert pas l'activation de Caspase-3, ni le changement de potentiel mitochondrial, ni l'externalisation de la phosphatidyl-serine ni la cassure de l'ADN.

III.6.2.2 - La β-caténine

Le blocage de la voie Wnt/β-caténine semble un élément important du mécanisme d'apoptose. L'activation d'un récepteur membranaire provoque une stabilisation de la β-caténine qui s'accumule et est dirigée vers le noyau, où, avec la coopération de facteurs de transcription, elle induit l'expression de gènes cibles (Peifer and Polakis, 2000; Polakis, 2001) (Figure 14). Ceci induit une prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (Orford et al., 1999)

Siah-1 et Siah-2 (en complexe avec APC) sont des médiateurs de la dégradation de la β-Caténine (Liu et al., 2001; Matsuzawa and Reed, 2001; Topol et al., 2003). D'après Iwai et collaborateurs, ce serait la forme longue de hSiah-1 (Siah-1L) qui serait responsable de la dégradation de la β-caténine *in vivo* en réponse à P53 (Iwai et al., 2004).



D'après (Matsuzawa and Reed, 2001)

Figure 14 : Les voies d'activation de la β-caténine

Des mutations ponctuelles de *siah-1* inhibent son action sur la dégradation de la β-Caténine et ainsi l'induction de l'apoptose (Kim et al., 2004).

III.6.2.3 - La protéine Pw1/Peg3

Durant une phase précoce de l'apoptose, la protéine pro-apoptotique Bax est transloquée du cytosol à la mitochondrie. Ce phénomène est sous la dépendance de la protéine à doigt de zinc Pw1/Peg3 (Deng and Wu, 2000) car l'inhibition de Pw1/Peg3 empêche la translocation de Bax dans la mitochondrie et donc le relargage du cytochrome C et l'activation des caspases.

Le gène codant pour Pw1/Peg3 est sous la régulation de P53 mais ne peut à lui seul (en l'absence de P53) induire l'apoptose. Une cotransfection de *siah-1a* et *Pw1/Peg3* peut en revanche induire l'apoptose (Relaix et al., 2000).

Siah-1a agirait donc en synergie avec Pw1/Peg3 pour induire l'apoptose.

III.6.2.4 - La protéine TRAF2

Siah-2 induit l'ubiquitination et la dégradation de TRAF-2 en réponse à des signaux apoptotiques (Habelhah et al., 2002). TRAF2 est un important régulateur des signaux apoptotiques. TRAF2, en réponse à NFκB, régule négativement les signaux apoptotiques venant de TNFR1 (Shu et al., 1996; Wang et al., 1998). TRAF2 induit la voie JNK en réponse au TNFα.

III.6.2.5 - La GAPDH

Comme nous l'avons déjà évoqué, il a très récemment été montré que Siah peut lier la GAPDH, une protéine de la glycosylation qui est transloquée au noyau durant l'apoptose. En réponse au stress, la GAPDH est S-nitrosylée, ce qui lui permet de se lier à Siah. Ce complexe stabilisant Siah est transloqué au noyau où il active l'apoptose en induisant notamment la dégradation de protéines nucléaires. Sans cette translocation nucléaire, l'activité pro-apoptotique de Siah est nettement affaiblie (Hara et al., 2005).

III.6.2.6 - Autres implications de Siah dans l'apoptose

Siah-1 est capable d'induire la dégradation du répresseur transcriptionnel TIEG1 (Johnsen et al., 2002). TIEG1 (*Transforming growth factor- (TGF)1-inducible early gene-1*) est induit par le TGF pour aller s'associer aux séquences riches en GC des promoteurs de ses gènes cibles pour réprimer leur expression. En réprimant certains gènes codants eux-mêmes pour des répresseurs transcriptionnel, TIEG1 est aussi capable d'induire l'expression de certains gènes, tel *p21*, de façon indirecte.

La surexpression de TIEG1 induit un arrêt de croissance et une apoptose accrue ce qui est contradictoire avec sa dégradation par la protéine pro-apoptotique Siah-1.

En interagissant avec le domaine de liaison à l'ADN de c-Myb, la partie N-terminale de Siah-1a joue un rôle dans la dégradation de c-Myb induite par P53 (Tanikawa et al., 2000). C-Myb est un activateur de transcription qui peut aussi se lier et activer la protéine de choc

thermique HSF3. Comme c-Myb est activée au moment de la transition G1/S, elle joue un rôle important dans le cycle cellulaire et l'apoptose.

La protéine Peg10, surexprimée dans certains cancers hépatiques, est capable de s'associer avec hSiah-1 et hSiah-2 et de diminuer l'apoptose induite par celles-ci (Okabe et al., 2003).

Siah-1 tout comme Siah-2 est capable d'induire la dégradation des protéines PML et PML-RAR ainsi que d'autres protéines de la famille TRIM (TRIM 5, 9 et 21) via le protéasome (Fanelli et al., 2004). Cette induction passe par le domaine RING de Siah et une interaction directe entre Siah et PML.

La protéine PML serait impliquée dans l'induction de l'apoptose et de l'arrêt de croissance cellulaire (Wang et al., 1998). C'est un corégulateur transcriptionnel qui interagit à la fois avec des activateurs et des répresseurs de la transcription (Vallian et al., 1997; Tsuzuki et al., 2000). PML est induite en réponse à un stress et facilite les modifications post-traductionnelles de P53 (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000).

III.6.3 - Autres fonctions cellulaires de Siah

Siah-1a et Siah-2 régulent la protéine majeure de la réponse à l'hypoxie : HIF-1α, via leur effet sur les protéines PHD1 et PHD3 (Habelhah et al., 2004), elles mêmes impliquées dans la dégradation de HIF-1α (Nakayama and Ronai, 2004). En l'absence de Siah, les protéines PHD ne sont plus dégradées et conduisent la totalité des protéines HIF-1α vers la dégradation.

A l'inverse, une hypoxie entraîne une transcription accrue de *siah-2* (Nakayama et al., 2004) ce qui permet l'activation de HIF-1α et donc une réponse appropriée au stress.

D'autres fonctions ont été suggérées pour Siah, mais en raison de leur caractère hypothétique ne seront pas développées ici.

La régulation de la quantité de diverses protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la mitose, la méïose ou l'apoptose permet à Siah de contrôler diverses étapes du cycle cellulaire.

Dégradation	***Ref***	***msiah-1a***	***msiah-1b***	***hsiah-1***	***hsiah-2***	***Fonction***
AF4	*(Oliver et al., 2004)*	+		+	+ *h,m*	?
β-catenin	*(Liu et al., 2001)*	+		+		apoptose
BOB1-OBF1	*(Tiedt et al., 2001)*			+		Facteur de transcription spécifique des lymphocytes
CtIP	*(Germani et al., 2003)*			+ *r*	+	inhibiteur de BRCA1 - impliqué dans la prolifération
DCC	*(Hu et al., 1997)*					récepteur à la Netrine - impliqué dans le développement neuronal
Fmr2		+			+ *m*	
Kid	*(Germani et al., 2000)*			+		éjection des chromosomes en fin de mitose - prolifération cellulaire
c-myb	*(Tanikawa et al., 2000)*	+				
NCoR	*(Zhang et al., 1998)*				+	répression de récepteurs nucléaires
Numb	*(Susini et al., 2001)*			+		régulateur de la protéine du développement Notch
2oxoglutamate dehydrogensase OGDHC-E2	*(Habelhah et al., 2004)*			+	+	enzyme limitante du cycle de Krebs
PHD1-PHD 3	*(Habelhah et al., 2004)*	+			+	régulation de HIF-1α en réponse à l'hypoxie
PML	*(Fanelli et al., 2004)*			+	+	
PML-RAR	*(Fanelli et al., 2004)*			+	+	
Polycystine	*(Kim et al., 2004)*			+		?
recepteur au glutamate	*(Ishikawa et al., 1999; Kammermeier and Ikeda, 2001)*	+	+	+	+	transduction du signal
Synaptophysin	*(Wheeler et al., 2002)*			+	+	régulation du relargage des neurotransmetteurs
synphyline	*(Nagano et al., 2003)*			+ *poly*	+ *mono-poly*	
TACC1	Dr. Still unpublished (http://www.roswellpark.org/document_3518_631.html)			+		?
TIEG1	*(Johnsen et al., 2002)*	+		+		
TRAF2	*(Habelhah et al., 2002)*				+	Apoptose - Réponse immunitaire
TStar/Salp1/SLA2	*(Venables et al., 2004)*			+		épissage alternatif

Liaison	***Ref***	***msiah-1a***	***msiah-1b***	***hsiah-1***	***hsiah-2***	***Fonction***
pAPC	*(Liu et al., 2001)*			+		
Bag1	*(Matsuzawa et al., 1998)*	+				
GAPDH	*(Hara et al., 2005)*			+	+	glycosylation - apoptose
Néogénine	*(Cooper, 2002)*		+			récepteur à la Netrine
Peg10	*(Okabe et al., 2003)*			+	+	
plectine	*(House et al., 2003)*					ancrage des protéines des filaments intermédiaires
PW1/Peg3	*(Relaix et al., 2000)*	+				translocation de Bax dans la mitochondrie - apoptose
SiahBPI/FBP-IR/ RoBP1/PUF60	*(Page-McCaw et al., 1999) (Page-McCaw et al., 1999) (Bouffard et al., 2000)*					facteur affectant la transcription du régulateur de l'apoptose myc
α-synuclein	*(Liani et al., 2004)*				*+mono*	inhibiteur de la neurotransmission de la Dopamine
SIP/CacyBP	*(Matsuzawa and Reed, 2001)*					?
TRAF2	*(Habelhah et al., 2002)*	+				
α-tubulin	*(Germani et al., 2000)*			+		?
Vav	*(Germani et al., 1999)*				+	relais cellulaire des récepteurs des lymphocytes

Tableau 2 : Les interactants des protéines Siah

De part leur très forte homologies, les protéines Siah ont des fonctions redondantes mais certains rôles ne sont remplis que par une des protéines de la famille. Leur fonction majeure : la dégradation de protéines cellulaires majeures conduisant dans certains cas à l' induction de l'apoptose (Roperch et al., 1999), alors que dans d'autres lignées il s'agit plutôt d'une diminution de la croissance cellulaire sans effet sur la mort cellulaire programmée (Matsuzawa et al., 1998; Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999).

III.7 - Les pathologies associées à Siah

III.7.1 - La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte des neurones dopaminergiques de la substance grise et la présence, dans les neurones survivants, d'inclusions cytoplasmiques enrichies en Ubiquitine appelées "corps de Lewy". La baisse de l'activité du protéasome dans la substance grise de patients atteints de la maladie de Parkinson a permis de supposer qu'une défaillance de la voie Ubiquitine/protéasome était impliquée dans la formation des corps de Lewy et la mort des neurones dopaminergiques. Siah a été retrouvé dans les corps de Lewy et 30% des corps de Lewy sont positifs pour Siah chez des patients atteints de la maladie de Parkinson (Liani et al., 2004).

III.7.2 - Le syndrome de Usher

Le syndrome de Usher de type 3 a été localisé en 3q21-q25 (Sankila et al., 1995). Il s'agit d'une maladie récessive autosomale qui conduit à la perte progressive des cheveux/poils et à la dégénération de la rétine.

Comme le gène *siah-2* se trouve en 3q25, son implication dans ce syndrome a été supposée, mais une analyse plus fine de sa localisation et de sa séquence chez des patients atteints de ce syndrome ont permis d'exclure cette hypothèse (Joensuu et al., 2001).

III.7.3 - L' infection bactérienne

Une infection bactérienne semble induire une forte activation de l'expression de *hsiah-2* (Boldrick et al., 2002).

III.7.4 - Le locus *siah-1b*

Le gène *siah-1b* aussi appelé *sinh1b* contient au moins 7 motifs formés d'une répétition de CAG, ce qui le rend sensible à une expansion des répétitions CAG ; Ce type d'expansion a déjà été impliqué dans l'apparition de différents syndromes (Abbott and Chambers, 1994).

III.7.5 - Le phénotype *tottering*

Le gène *siah-1a* est localisé sur le chromosome 8, très proche d'un locus connu pour porter le mutant neurologique *tottering* (Green and Sidman, 1962). Les souris *Tottering* sont utilisées comme modèles de l'épilepsie. Comme Sina est impliquée dans la neurogénèse, on pouvait penser que le phénotype *tottering* était dû à une mutation de *siah-1a.* Mais l'analyse de la séquence *siah-1a* dans les souris *tottering* a permis d'écarter cette hypothèse (Holloway et al., 1997).

III.7.6 - L'oligosyndactylie

Le gène *siah-1a* est aussi localisé dans une région responsable de l'oligosyndactylie, une maladie affectant la formation des reins et des doigts/orteils chez les hétérozygotes. L'embryogénèse est stoppée au stade 64 cellules lors d'une mutation homozygote dans cette région (Zalups, 1993).

Des études génétiques n'ont pas permis de discerner *siah-1a* de la zone responsable de la syndactylie (Holloway et al., 1997). Mais l'implication de Siah-1a dans cette pathologie n'a toujours pas été prouvée.

III.7.7 - Les phénotypes localisés proches des gènes *siah*

Certains phénotypes humains et murins seraient dus à des mutations touchant des gènes proches des loci des différents gènes *siah* (Holloway et al., 1997). Il est intéressant de noter que bien que ces pathologies soient différentes, elles ont tout de même certains phénotypes communs. On note ainsi qu'un grand nombre de ces pathologies sont associées à des défauts du squelette, des phalanges, des reins ou de l'ouïe. Des défauts des yeux sont également relevés dans certains mutants, ils entraînent notamment l'apparition d'une cataracte.

Les phénotypes localisés proches du gène *msiah-2* n'ont pas été retrouvés dans les souris KO (Hammond, Della and Bowtell résultats non publiés) ce qui exclu que Siah-2 soit impliquée dans l'apparition de ces troubles.

III.7.8 - Les cancers

Siah-1 et *siah-2* sont exprimés dans un grand nombre de tissus cancéreux à des niveaux extrêmement variables (Hu et al., 1997; Ross et al., 2000; Su et al., 2001). Les mutations des 2 allèles *hsiah-1* semblent rares dans les cancers (Medhioub et al., 2000).

Bien que *siah-1* ait été retrouvé exprimé dans 100% des cancers testés en RNAse protection par l'équipe du Dr Fearon (Hu et al., 1997) *hsiah-1* est généralement sous exprimé dans les cancers par rapport aux cellules normales.

De plus l'homologue de drosophile, Sina, est connue pour faire partie de la voie Ras (Zipursky and Rubin, 1994) une protéine reconnue pour son activité oncogénique.

III.7.8.1 - Les carcinomes

Les gènes *siah* ont été localisés dans des zones connues pour porter des gènes mutés dans les cancers. Le bras long du chromosome 16 est souvent trouvé délété dans des analyses de tissus tumoraux (Medhioub et al., 2000). Ceci suggère la présence de gènes suppresseurs de tumeur sur le bras long du chromosome 16. Comme *hsiah-1* est localisé sur le chromosome 16q, une analyse de sa séquence et de son expression a été effectuée dans diverses tumeurs et lignées cancéreuses. Elle ne montre pas de mutation sur l'allèle préservé ni de changement du niveau d'expression de l'ARNm *siah-1*. Mais ces résultats n'excluent pas totalement l'implication de Siah-1 dans ces cancers.

Les carcinomes hépatiques sont souvent associés à des pertes d'hétérozygotie. Le chromosome 16 est souvent affecté par des délétions, en particulier en 16q12, là où se trouve

le gène codant pour Siah-1. Siah-1 est 8 à 10 fois plus exprimé dans le foie de personnes saines que dans les carcinomes hépatocellulaires (Matsuo et al., 2003; Okabe et al., 2003). Siah-1 n'a été observé surexprimé dans aucun carcinome hépatocellulaire. L'expression de Siah-1 est significativement diminuée dans les tumeurs de stade avancé. Il faut aussi noter que la surexpression aberrante de la voie Wnt (régulée par Siah, comme expliqué plus bas) par une β-Caténine ou une Axine mutante est considérée comme une cause majeure de carcinogénèse hépatique. L'ARNm *hsiah-2* est sous exprimé dans les hépatocarcinomes cellulaires comparés à des foies normaux (Xu et al., 2001; Okabe et al., 2003).

III.7.8.2 - Les cancers gastriques

Deux mutations ont été trouvées dans le gène *siah-1* de patients atteints de cancers gastriques. Ces mutations induisent une stabilisation de la β-Caténine et une apoptose défaillante (Kim et al., 2004).

III.7.8.3 - Les lymphomes

Lors de la progression des lymphomes, on observe une altération de l'expression de certains gènes notamment due à un changement du nombre de copies de ces gènes.

Parmi les gènes dont l'expression est dérégulée se trouve *siah-1*. Il est situé dans une zone présentant des anomalies chromosomiques lors de la transformation cellulaire (Martinez-Climent et al., 2003)

III.7.8.4 - Les cancers du sein et du colon

Une analyse algorithmique de l'expression de différents gènes au sein de tissus tumoraux a permis de montrer que le niveau d'expression de *siah-1* corrélée à celle de 2 autres gènes (*kératine* 8 et *DRPLA*) permettait de distinguer les tumeurs portant une mutation de *brca1* de celles avec une mutation *brca2* (Kim et al., 2002).

Siah-2 est généralement surexprimé dans un grand nombre de carcinomes mammaires (Perou et al., 1999; Roh et al., 2004).

Siah-1a est exprimé en plus grande quantité dans les colons ou les seins de patients sains que dans ceux présentant un cancer (Nambiar et al., 2002).

Le gène codant DCC est localisé sur une partie de chromosome 18q délétée dans 70% des cancers colorectaux d'où son nom : *Deleted in Colorectal Cancer*. La protéine DCC est transmembranaire et porte des domaines similaires aux immunoglobulines, mais sa fonction reste mal connue. On sait qu'elle est abondante dans le cerveau et dans les tissus neuronaux en développement dans les embryons de vertébrés. Les protéines Sina/Siah induisent l'ubiquitination et la dégradation de DCC par le protéasome (Hu et al., 1997).

III.8 - *siah-1* est un gène majeur de la réversion tumorale

III.8.1 - *siah-1* est surexprimé dans les cellules révertantes

Nous avions initialement trouvé *siah-1b* dans le modèle des cellules LTR6 comme un gène activé par P53 (Amson et al., 1996) (voir II.5.4.3 - page 23). Mais nous avons ensuite retrouvé *siah-1* surexprimé dans les modèles de réversion tumorale de leucémie (Nemani et al., 1996) et de sein (résultats non publiés).

Nous avons pu mettre en évidence une très légère augmentation de la protéine Siah-1 dans certains modèles révertants de tumeur du sein (résultats non publiés).

III.8.2 - Siah-1 joue un rôle actif dans la réversion tumorale

Par la suite, nous avons montré que Siah-1 n'est pas seulement activé mais peut mimer la réversion tumorale de cellules leucémiques et mammaires. En effet, la surexpression de Siah entraîne l'apoptose de ces cellules, mais surtout réduit fortement le caractère tumorigène de ces cellules lorsqu'elles sont injectées en souris *scid/scid* (Nemani et al., 1996; Roperch et al., 1999; Tuynder et al., 2002).

Sur les cellules de cancer du sein MCF7, notre équipe a également montré en microscopie confocale que la surexpression de Siah-1 permettait aux cellules tumorales de réacquérir certaines caractéristiques de cellules normales en culture tridimensionnelle (Bruzzoni-Giovanelli et al., 1999). Ces cellules poussent de façon organisée et réexpriment le marqueur E-Cadhérine (Figure 15 : E-Cadhérine en vert et noyaux en rouge).

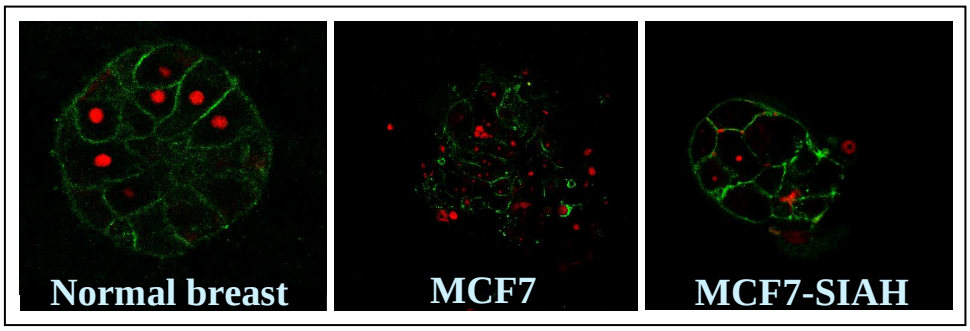


Figure 15 : Réorganisation des cellules tumorales cultivées en 3D suite à la surexpression de Siah-1

On peut noter une ressemblance entre la structure en acini adoptée par les cellules normales (et approchée par les cellules transfectées) avec la structure de l'omatidia de drosophile (Figure 7 page 33) qui est aussi contrôlée par Sina.

En outre, comme nous l'avons précédemment expliqué, ces cellules présentent une prolifération diminuée par rapport aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Cet effet serait dû à un effet de Siah-1 sur la séparation des noyaux et la cytokinèse.

La surexpression de Siah-1 induit également des changements de niveau d'expression de certaines protéines semblables à ceux observés dans les cellules révertantes. Ainsi la protéine TCTP, qui semble jouer un rôle majeur dans la réversion tumorale (Tuynder et al., 2004) est sous exprimée dans les révertantes comme dans les transfectants *siah-1* (Tuynder et al., 2002).

La protéine Siah-1 est donc surexprimée dans les cellules révertantes, et si l'on reproduit ce phénomène par transfection dans les cellules tumorales, celles-ci acquièrent un phénotype révertant.

IV - Siah-1b est un effecteur de P53

Comme nous venons de le voir les protéines Siah et P53 possèdent des activités cellulaires communes que sont le blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. C'est en fait grâce à Siah que P53 peut avoir une partie de ses activités.

IV.1 - Les corrélations entre l'expression de Siah et P53

Notre équipe a été la première à montrer que *siah-1b* (TSAP3) est induit par P53 (Amson et al., 1996) dans un modèle de cellules exprimant une P53 thermosensible (Michalovitz et al., 1990; Milner and Medcalf, 1990; Yonish-Rouach et al., 1991) (voir II.5.4.3 - *Les gènes* tsip *et* tsap page 23). Nous avons pu confirmer cette observation par de nombreuses expériences chez l'homme et la souris (Nemani et al., 1996; Hu et al., 1997; Roperch et al., 1999; Relaix et al., 2000; Susini et al., 2001).

Par la suite, différentes équipes ont montré que *siah* (humain ou murin) est activé par P53 dans des modèles de P53 surexprimée (Hu et al., 1997; Matsuzawa et al., 1998; Liu et al., 2001; Maeda et al., 2002) ou d'activation de P53 thermosensible (Hu et al., 1997).

Les résultats de l'équipe de Fearon montrent que l'induction de *siah-1b* par P53 ne serait effective qu'en cas d'induction d'apoptose et pas en cas d'arrêt de croissance.

Ces résultats ont été confirmés par des équipes ne travaillant absolument par sur *siah* : L'analyse de l'expression de multiples gènes dans des cellules isogéniques ne différant que dans leur niveau de P53 a permis de montrer que parmi plusieurs gènes affectés par la dose de P53 se trouve *hsiah-1* (Yoon et al., 2002)

L'expression de hSiah-2 a elle aussi été corrélée à P53 (Topol et al., 2003; Xia et al., 2004).

Pourtant dans de récents travaux, Iwai et collaborateurs ont montré que les 2 formes de hSiah-1 ne réagissent pas de la même façon à P53 . Selon eux, seule la forme longue de *hsiah-1* (*siah-1L*) est régulée par P53 (Iwai et al., 2004).

Si au final l'activation de *siah* par P53 est globalement reconnue, rien ne prouvait que *siah* était une cible directe du régulateur transcriptionnel P53.

Un site potentiel identifié dans le promoteur de *hsiah-1* ne s'est pas révélé être activé par P53 (Maeda et al., 2002). Mais l'analyse génomique de *siah-1* n'a pas été poussée pour trouver un éventuel autre site dans une région intronique ou plus éloignée de l'initiation de la transcription.

Une étude théorique menée par l'équipe de Levine a mis en évidence un algorithme permettant d'identifier des gènes répondant à P53. Parmi eux se trouve *hsiah-1* (Hoh et al., 2002). Ce qui suggère l'effet direct de P53 sur l'expression de *hsiah-1*.

IV.2 - L'activité cellulaire de P53 *via* Siah

Tout comme P53, Siah peut induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Et puisque P53 peut réguler l'expression de Siah et donc son activité, on pouvait penser que Siah était un relais de P53.

Il a été montré que l'induction de l'apoptose par P53 pouvait passer par la dégradation de la β-caténine, celle-ci étant en partie due à Siah-1 (Liu et al., 2001; Matsuzawa and Reed, 2001)

P53 peut réguler l'activité des protéines de choc thermique (HSP) *via* les facteurs de choc thermique (HSF). Ainsi l'activation de HSF3 par c-Myb est inhibée par P53 qui à la fois bloque l'interaction des deux protéines et en plus dégrade c-Myb. Cette dégradation est en partie due à Siah (Tanikawa et al., 2000; Tanikawa et al., 2001).

La surexpression de P53 dans les cellules 293 entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm *siah-1a*, mais surtout leur arrêt de croissance. Or si l'on surexprime en même temps la protéine Bag1qui régule négativement l'activité de Siah on réverse partiellement ce blocage (Matsuzawa et al., 1998). On peut supposer que l'effet de Bag-1 dans la fonction cellulaire P53 passe par l'inhibition de Siah. Ceci est un élément supplémentaire pour dire que la fonction de P53 passe par Siah.

La place de Siah dans la voie P53 est renforcée par le fait que P21, un des effecteurs de P53, affecte l'expression de *siah-1* (Linares-Cruz et al., 1998; Liu et al., 2001; Maeda et al., 2002).

IV.3 - La controverse

Malgré toutes ces évidences, certaines équipes ne parviennent pas à reproduire les résultats d'activation de Siah par P53 chez la souris. Ainsi l'équipe de Bowtell persiste à mettre en doute cette relation entre *siah* et P53. En effet ils consacrent une page entière d'un article (Frew et al., 2002) à montrer que l'activation de P53 n'entraîne pas d'augmentation de Siah. Ils utilisent différents systèmes cellulaires (tissus, cellules immortalisées, *p53* nul, P53 thermosensible, P53 endogène) et plusieurs activateurs de P53 (irradiation gamma, ultraviolets, etoposide, doxorubicine), mais ne détectent *a priori* jamais d'effet sur Siah.

Certaines expériences ont pour contrôle positif l'augmentation de l'expression de P53. Or on sait notamment que dans certaines tumeurs comportant un niveau de P53 élevé, le niveau des cibles de P53 telles P21, Cycline G ou GADD45, peut être relativement faible. Comme la séquence de ce *p53* est sauvage, cet effet serait du à un défaut de P53 dans sa capacité de liaison à l'ADN et transactivatrice, notamment en raison de modifications post-traductionnelles (Gu and Roeder, 1997; Satyamoorthy et al., 2000; Minamoto et al., 2001).

Il faut aussi noter que *bax*, un gène au rôle majeur dans l'apoptose, présente un pattern d'induction par P53 qui est cellule-spécifique (Canman et al., 1995). Ceci pourrait aussi être le cas pour *siah*.

En outre l'analyse des résultats semble assez discutable puisque tout d'abord les *Northern blot* sont difficiles à interpréter (non équilibrés ou surexposés) et surtout ils utilisent une sonde ne reconnaissant que *siah-1a* malgré ce qui est indiqué dans la légende. Or comme le montre l'équipe de Fearon parmi les 3 gènes *siah* murins, seul *siah-1b* est sensible à P53 (Hu et al., 1997).

Par contre les *Western blot* sont réalisés avec des outils reconnaissant à la fois Siah-1a et Siah-1b mais, ayant la même taille, on ne peut pas les différencier.

Afin de trancher sur une partie de ce problème nous avons choisit de vérifier si le gène* siah-1b *était effectivement activé par P53.

IV.4 - Le gène *siah-1b* est directement régulé par P53

De manière à conclure sur la relation parfois controversée entre P53 et *siah* nous avons entrepris la recherche d'un site consensus de liaison de P53 dans la zone du chromosome X contenant le gène *siah-1b*.

Les logiciels standards n'ayant pas détecté de tel site, c'est par de façon semi-manuelle que nous avons pu mettre en évidence une séquence ressemblant au site consensus de liaison de P53. Ce site malgré son caractère non conventionnel s'est révélé capable de lier et d'être activé par la protéine P53 *in vitro* comme *in vivo*.

Article 1

Siah-1b is a direct transcriptional target of P53: identification of the functional P53 responsive element in the *siah-1b* promoter.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 9;101(10):3510-5. Epub 2004 Feb 25.

***Nous avons donc prouvé que* siah-1b *peut être transactivé par P53, suite à la liaison de cette protéine sur le promoteur du gène* siah-1b.**

Il conviendrait désormais de déterminer dans quelles conditions physiologiques l'activation de P53 entraîne une induction de Siah-1b, puisque l'on sait que suivant le stimulus reçu par P53, différentes voies sont activées.

Il serait intéressant d'étudier l'hypothèse selon laquelle le caractère non conventionnel du site de liaison de P53 pourrait permettre une régulation particulière de* siah-1b *par rapport aux autres gènes cibles de P53.

Bien qu'au niveau cellulaire il semble que les protéines Siah ne soient pas indispensables aux activités de P53 sur l'apoptose et la prolifération, afin d'approfondir la connaissance des liens entre Siah et P53, il serait intéressant de voir dans les différentes voies de P53 quelle fonction est assumée par Siah-1b.

IV.5 - Perspectives : Génération de souris KO pour *siah-1b*

Afin de compléter notre étude de Siah sur un plan fonctionnel, nous avons voulu générer des souris knock-out (KO) pour Siah. Une telle stratégie a déjà été utilisée par l'équipe de Bowtell qui a pu générer des souris KO pour *siah-1a* et *siah-2* (Dickins et al., 2002; Frew et al., 2002; Frew et al., 2003; Frew et al., 2004).

La génération de souris portant un gène *siah-1b* invalidé, a, pour l'instant, conduit à la mort prématurée des embryons (Frew et al., 2002). Ceci suggère donc un rôle primordial de Siah-1b dans le développement embryonnaire.

Afin d'obtenir des souris viables, nous avons choisi, de notre côté, d'induire cette délétion à différents stades de développement de la souris et de déterminer à quel stade Siah-1b joue son rôle clé.

Notre stratégie consiste à déléter l'entièreté de la séquence codante de *siah-1b* ainsi qu'une partie de ses extrémités 5' et 3' non traduites. Pour cela nous avons purifié de l'ADN génomique à partir de cellules ES dérivées des souris dans lesquelles nous avions prévu de générer les KO : souris C3H.

Une amplification par PCR grâce à une Taq polymérase très fidèle nous a permis d'amplifier les 5,8kb d'ADN génomique du chromosome X contenant le gène *siah-1b*.

Nous avons inséré des sites de restriction à chaque extrémité de ce produit d'amplification afin de le cloner dans un vecteur pBluescript (pBS).

Nous avons tiré profit de sites de restriction uniques présents sur l'ADN génomique : EcoRI et NotI pour insérer un site LoxP en 5' et une cassette néomycine entourée par 2 sites

LoxP en 3' (Figure 16). La cassette néomycine (NEO) permet de sélectionner les cellules ES ayant intégré la construction.

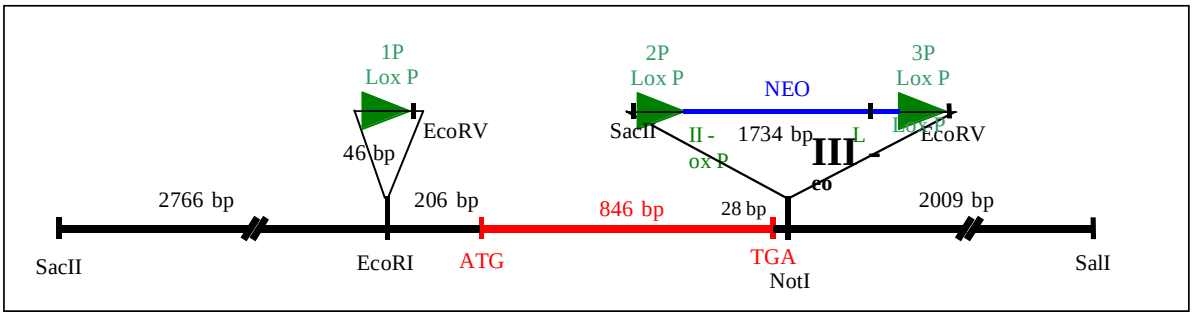


***Figure 16 : Construction pour le KO* siah-1b**

La recombinase CRE agit sur les sites LoxP pour induire une recombinaison homologue, ce qui permet l'excision de l'ADN entre 2 LoxP. Les sites LoxP sont orientés : la recombinaison ne se fait qu'entre 2 sites de même orientation.

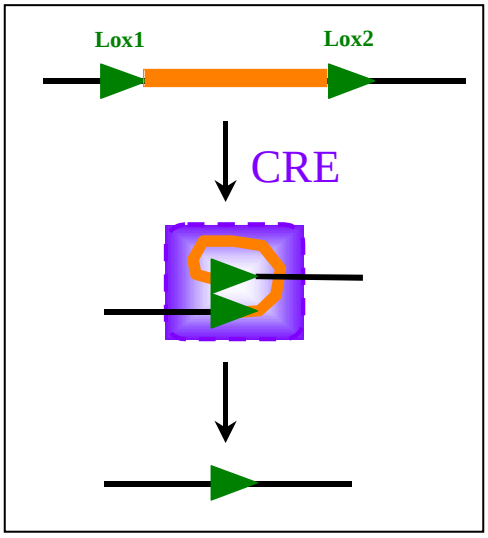


Figure 17 : Le système de recombinaison CRE-lox

La construction contenant le gène *siah-1b* flanqué de ses régions 3' et 5' UTR dans lesquelles nous avons inséré des sites LoxP et la cassette NEO est injectée dans les cellules ES des souris. Les cellules ayant intégré la construction dans leur génome sont sélectionnées en présence de néomycine. Des criblages par Southern Blot et PCR permettent de vérifier que l'insertion s'est bien faite au bon endroit et entièrement.

Une fois ces cellules sélectionnées, on les cultive en présence de la protéine CRE de façon à induire la recombinaison homologue de manière à retirer le gène codant la néomycine afin qu'il n'interfère pas dans les souris.

Comme il y a 3 LoxP et que la recombinaison se fait entre 2 sites, il y a 3 possibilités de recombinaison homologue : entre 1P et 2P
entre 1P et 3
entre 2 et 3P

Nous pouvons sélectionner les cellules qui n'ont perdu que leur cassette NEO (recombinaison entre 2P et 3P) après analyse par Southern blot avec des sondes spécifiques de la cassette NEO. Les cellules ayant sur leur chromosome X la construction avec les 2 sites LoxP 1P et 2P (mais pas la cassette NEO) sont injectées dans des blastocystes de souris eux mêmes introduits dans des souris gestantes. Les souris chimériques issues de ce transfert sont croisées entre elles. Lorsque 2 souris ayant la construction dans leurs cellules germinales sont croisées, elles engendrent des souris portant la construction dans toutes leurs cellules.

Il suffit alors de croiser ces souris avec des souris transgéniques pour la recombinase CRE. Deux stratégies sont alors possibles : exciser le gène dans tout le corps en même temps, ou bien dans un organe donné ou seulement à un temps donné. Pour cela on utilise des souris dans lesquelles le gène *cre* est sous la dépendance, respectivement, d'un promoteur ubiquitaire, d'un promoteur régulé par un facteur de transcription spécifique d'un organe ou d'un stade de développement.

D'après les premières tentatives de génération de souris KO pour *siah-1b*, le gène serait si important pour le développement embryonnaire que les embryons KO pour *siah-1b* ne peuvent se développer. Si nous observons également ce phénomène, nous prévoyons, grâce à des souris CRE temps spécifique, d'induire la délétion de *siah-1b* à différents stades du développement embryonnaire et une fois celui-ci terminé.

L'étude des souris KO pour* siah-1b *nous permettra de mieux comprendre la fonction de Siah-1b, notamment au cours du développement embryonnaire. En activant P53 (induction de lésions, de stress, ou surexpression d'un transgène) dans des souris WT et KO pour* siah-1b*, on pourra déterminer quelle part de la fonction de P53 passe par la voie Siah-1b.

Introduction à la protéine TSAP6

V - Introduction à la protéine TSAP6

TSAP6, aussi connue sous le nom de pHyde et Dudulin-2, est une protéine de ~50kDa dont l'ARNm a été isolé par notre équipe (Amson et al., 1996) et trouvé différentiellement exprimé dans la lignée LTR6 de souris comportant une P53 thermosensible (Yonish-Rouach et al., 1991).

V.1 - Les protéines de la famille STEAP

TSAP6 fait partie d'une famille de protéines à 5/6 domaines transmembranaires comprenant STEAP1, STAMP1=STEAP2 et TIARP (Tableau 3 page 76). Malgré leurs homologies de séquence, on ne connaît pas pour l'instant de fonction commune à toutes ces protéines. Il a pourtant été suggéré (Sanchez-Pulido et al., 2004) que ces protéines puissent lier l'hème et avoir une fonction d'oxydo-reductase. Ceci n'a pas encore pu être démontré.

Selon les logiciels de prédiction des domaines fonctionnels, elles comportent :

- 5-6 domaines transmembranaires (5 selon les logiciels SMART et TMHMM et 6 selon les logiciels HMMTOP et SOSUI) qui ont été nommés ACRATA pour "***A**poptosis, **C**ancer and **R**edox **A**ssociated **T**ransmembr**A**ne domain*" (Sanchez-Pulido et al., 2004).
- un domaine C-terminal qui pourrait promouvoir une oligomérisation
- un domaine N-terminal comportant un domaine de type Rossman fold homologue à celui trouvé dans les NADH/NADPH oxydo-réductases
- un domaine de type hemopexin qui pourrait permettre la liaison de l'hème

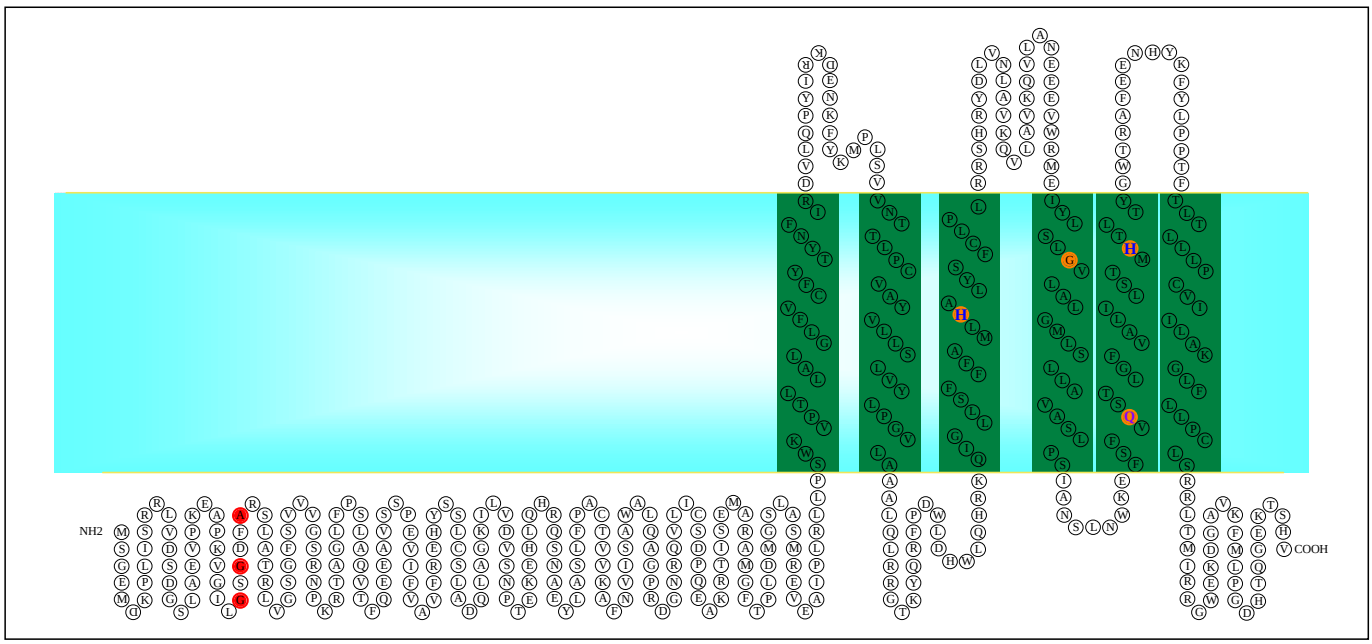


Figure 18 : Structure prédite de la protéine TSAP6 à la membrane plasmique dans l'hypothèse de 6 domaines transmembranaires

V.1.1 - Brève description de TSAP6

La séquence de t*sap6* est particulièrement conservée au cours de l'évolution des mammifères par rapport à la moyenne des autres gènes (Castillo-Davis et al., 2004) ce qui suggère un rôle important de TSAP6 dans la cellule. Chez l'humain, *tsap6* est localisé en 2q14.2 (Passer et al., 2003), et chez la souris sur le chromosome 1.

L'analyse par *Northern blot* et PCR-Q de certains tissus a permis de montrer que *tsap6* est exprimé à des niveaux différents suivant les organes (Passer et al., 2003). D'après la PCR-Q, l'organe où l'expression de *tsap6* est la plus abondante est la prostate : la quantité d'ARNm *tsap6* y est au moins 2 fois plus élevée que dans les autres tissus humains (Porkka et al., 2003).

L'anticorps dirigé spécifiquement contre un peptide de TSAP6 reconnaît 2 formes en *Western blot* (Passer et al., 2003), ce qui suggère des modifications post-traductionnelles.

Zhang et coll. ont montré que dans des conditions de surexpression rpHyde (*rat* pHyde) avait une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique (Zhang et al., 2001).

Les fonctions de TSAP6 seront abordées plus loin.

V.2 - Les homologues de TSAP6

homologue	chr humain	ACC N°	% homologies hTSAP6	chr souris	ACC N°	% homologies mTSAP6
TSAP6-pHyde -dudulin2	2q14.2	AAH42150	x	1	AAO38239	x
STEAP1	7p22.3	AF186249	58%	5		
STEAP2-STAMP1	7q21	AF455138	67%			
TIARP – STAMP2	7	NP_078912	62%	5	AJ319746	60%

Tableau 3 : TSAP6 et ses homologues

V.2.1.1 - La protéine STEAP (Six Transmembrane Epithelial Antigene of the Prostate)

Steap a été identifié par hybridation soustractive dans des xénogreffes issues de métastases de cancer prostatique, et se trouve préférentiellement au niveau de l'épithélium glandulaire de la prostate saine comme cancéreuse (Hubert et al., 1999; Ernst et al., 2002; Vanaja et al., 2003). Il semble plus exprimé dans les tissus prostatiques cancéreux que dans les tissus sains (Yang et al., 2001; Kakiuchi et al., 2003).

L'ARNm et la protéine STEAP sont exprimés dans un grand nombre de cancers (prostate, pancréas, colon, vessie, EWS, faiblement dans les testicules et parfois dans les cancers du sein, du cou, des ovaires, de l'estomac) (Kim et al., 2003; Zucchi et al., 2004) et dans un grand nombre de lignées ou xénogreffes de tumeur de la prostate et du colon (Hubert et al., 1999).

Steap est localisé en 7p22.3, une région reconnue comme impliquée dans les cancers de la prostate, mais son expression ne varie pas lors d'une privation ou d'une stimulation par les androgènes (Hubert et al., 1999).

Elle présente en immunohistochimie un marquage à la membrane plasmique. Différentes techniques permettant de détecter des protéines ayant un domaine extracellulaire ont montré que STEAP se trouve effectivement à la membrane plasmique, avec ses 2 extrémités orientées vers le cytoplasme. De plus certains tissus présentent un faible niveau de STEAP cytoplasmique.

Steap est réprimé dans les cellules sénescentes (Chang et al., 2002). *Steap* est exprimé dans les blastocystes (Stanton and Green, 2002).

Le niveau d'expression de STEAP corrèle avec le stade de la tumeur prostatique (Li et al., 2004). En effet, les tumeurs les plus avancées expriment fortement STEAP et les prostate non tumorales pas du tout.

En raison de ses qualités immunogènes et de marqueur de tumeur, il pourrait être une cible de choix pour une immunothérapie anticancéreuse (Rodeberg et al., 2005).

V.2.1.2 - La protéine STEAP-2 = STAMP1 (Six TrAnsMembrane protein of Prostate 1)

Steap2 a également été cloné par hybridation soustractive dans des cancers prostatiques (Korkmaz et al., 2002; Porkka et al., 2002).

Steap2 est exprimé majoritairement dans la prostate surtout si celle-ci est cancéreuse. Contrairement à d'autres marqueurs des cancers prostatiques, l'expression de STEAP2 ne varie pas dans les cellules traitées aux androgènes et n'est pas régulée par une hyperméthylation du gène (Korkmaz et al., 2002; Porkka et al., 2002).

Dans des conditions de surexpression, STAMP1 est détectée à la membrane plasmique et au niveau du trans-golgi, ainsi que dans des structures vésiculaires dans le cytoplasme. La localisation de STAMP1 au trans-Golgi est inhibée par la brefeldine A. STAMP1 suit un trajet antéro- et rétrograde vers et depuis le Golgi. STAMP1 serait impliquée dans la voie de sécrétion et d'endocytose.

V.2.1.3 - La protéine TIARP (TNFα Induced Adipose Related Protein)

Mtiarp a été identifié par *differential display* dans un modèle murin de différenciation de cellules adipocytaires en réponse au TNFα (Moldes et al., 2001).

Il est fortement exprimé dans un grand nombre de tissus (Porkka et al unpublished) contrairement à *steap* qui est majoritairement prostatique : il est détecté chez le rat par Northern Blot dans les tissus adipeux blancs et bruns, dans le foie, les reins, le cœur et les muscles squelettiques, très faiblement dans les poumons et la rate mais pas dans le cerveau ni l'intestin. TIARP n'est pas détectée dans les cellules 3T3-L1 en croissance mais apparaît quand les cellules se différencient à confluence.

Des études d'immunofluorescence et de fractionnement montrent que TIARP est principalement localisée à la membrane plasmique (extrémité N-terminale intracellulaire) mais aussi présente au niveau du golgi. Elle contient un motif de liaison ATP/GTP. On pense qu'elle pourrait interagir avec les cavéolines (Chambaut-Guerin and Pairault, 2005).

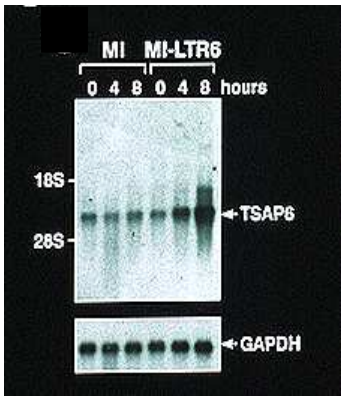
Différentes voies d'activation de l'expression de TIARP ont été décrites. TIARP est stimulée au niveau de son ARNm par 16h de traitement avec de l'hormone de croissance, mais l'expression de *tiarp* est diminuée par l'isoproterenol, l'insuline ou la dexamethasone (Fasshauer et al., 2003). L'activation de *tiarp* par la GH peut être inhibée par des inhibiteurs de Jak2 et p42/44MAPK. L'IL-6 induit l'expression de l'ARNm *tiarp* dans certaines cellules graisseuses de façon dose et temps-dépendante (Fasshauer et al., 2004). Le niveau basal de l'ARNm *tiarp* dans les cellules 3T3-L1 peut être significativement baissé par un traitement avec AG490 (inhibiteur de Jak2), mais pas par des inhibiteurs de p44/42 MAPK, p38 MAPK ou PI3K. L' inhibiteur de Jak2 réverse aussi partiellement l'effet de l'IL-6.

TIARP est surexprimée dans des souris présentant des problèmes pulmonaires aigus suite à une exposition au nickel (McDowell et al., 2003).

Lors d'un dépistage des gènes affectés par le KO du gène *ikkα* (*inhibitor of κB kinase*), *tiarp* a été retrouvé moins exprimé dans les cellules issues de souris KO que dans les cellules normales *(Chaisson et al., 2004).* Les souris KO pour *ikkα* présentent des défauts de la différentiation des glandes mammaires dus à un manque d'activation de NFκB.

V.3 - La régulation de l'expression de TSAP6 par P53

Une analyse pares expériences de *cDNA differential display* menées par notre laboratoire montrent que les cellules LTR6 (contenant une P53 thermosensible) cultivées à 32°C contiennent plus d'ARNm codant pour TSAP6 que ces même cellules cultivées à 37°C (Amson et al., 1996; Passer et al., 2003). Le passage de ces cellules de 37 à 32°C entraîne l'activation de P53 en lui rendant une fonction de type sauvage et déclenche l'apoptose et l'arrêt de croissance (Yonish-Rouach et al., 1991).

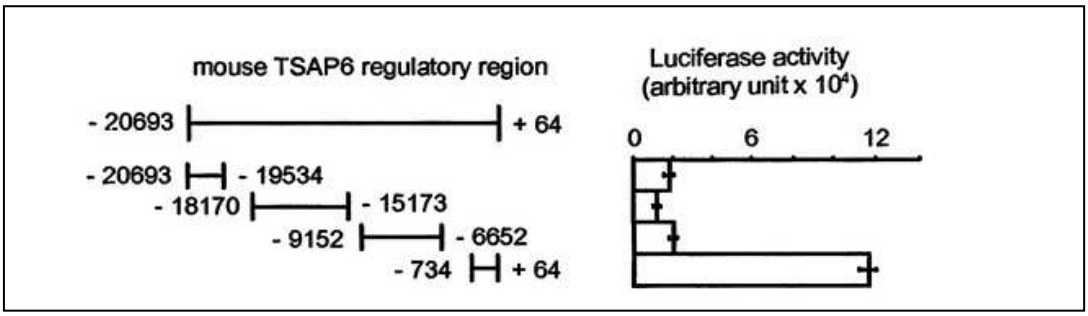


D'après (Passer et al., 2003)

Figure 19 :* Northern blot *montrant que l'expression de* tsap6 *est régulée par P53

De la même façon l'expression de l'ARNm *tsap6* est augmentée dans les cellules MCF7 entrées en apoptose suite à un traitement à l'actinomycine D, connue pour activer P53 (Passer et al., 2003).

Nous avons montré que le promoteur de *tsap6*, chez l'homme comme chez la souris, contient un site qui peut être activé par P53 (Passer et al., 2003).



D'après (Passer et al., 2003)

Figure 20 : Activité luciférase montrant la régulation du promoteur* tsap6 *par P53

L'induction de l'expression de *tsap6* par P53 lors du déclenchement de l'apoptose serait donc le résultat d'une action directe de P53 sur le promoteur de TSAP6.

V.4 - TSAP6 dans la réversion tumorale

L'expression de *tsap6* est augmentée dans les cellules révertantes (KS et US) par rapport aux cellules leucémiques parentales (K562 et U937) (Figure 21), ce qui indique que TSAP6 est une molécule impliquée dans le mécanisme de réversion tumorale. Cette surexpression dans les cellules révertantes a été confirmée dans des modèles de cancer du sein (M. Tuynder, résultats non publiés).

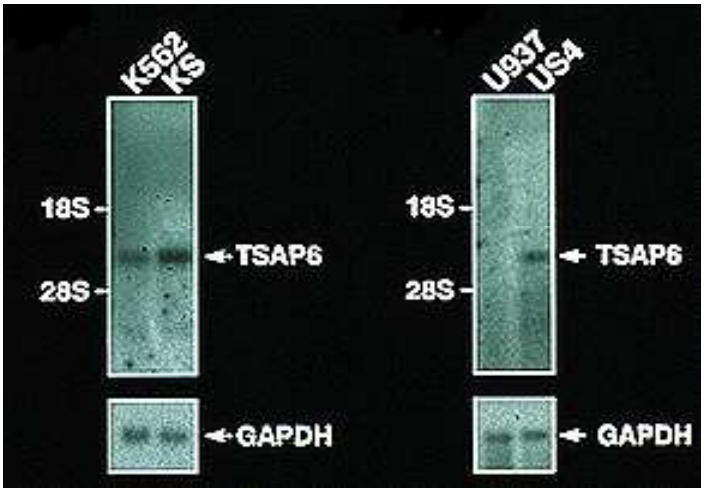


Figure 21 : Northern blot montrant l'expression de* tsap6 *dans les cellules révertantes

De la même façon *rpHyde* a été trouvé différentiellement exprimé dans 2 lignées de cancer de prostate dérivant de la même cellule mais ayant un phénotype différent : l'une métastatique et l'autre non (Rinaldy et al., 2000; Steiner et al., 2000).

De plus les tumeurs faiblement différenciées et non traitées (les plus agressives) expriment moins de PHyde que les tumeurs très ou moyennement différenciées (Porkka et al., 2003). En outre l'ARNm codant pour la Dudulin-2 est réprimé dans les cancers cirrhotiques par rapport aux cirrhoses, plus bénignes (Coulouarn et al., 2005).

Dans les tumeurs induites par injection de cellules tumorales en souris *nude*, la surexpression de rPHyde réduit fortement la vitesse de croissance et la taille de la tumeur. Le fait que les tumeurs ainsi traitées possèdent un grand nombre de cellules en apoptose (Steiner et al., 2000) pourrait expliquer ce manque d'efficacité des tumeurs à se développer.

TSAP6, étant positivement régulée par P53 et lors de la réversion tumorale, elle apparaît comme une protéine impliquée dans les mécanismes mis en jeu par la cellule pour lutter contre le phénotype cancéreux.

V.5 - TSAP6 et l'apoptose

Plusieurs études ont montré que TSAP6 dans différents types cellulaires possède une activité pro-apoptotique.

Ainsi la surexpression de TSAP6 dans différents types cellulaires induit leur entrée en apoptose (Rinaldy et al., 2000; Steiner et al., 2000; Zhang et al., 2001). Cet effet peut être réversé par l'utilisation de siRNA *tsap6* dans ces cellules. L'inhibition de l'expression de TSAP6 (antisens) dans les cellules LTR6 diminue la proportion de cellules entrant en apoptose après induction de P53 à 32°C (Passer et al., 2003).

L'analyse, par la technique de double hybride en levure, des protéines interagissant avec TSAP6 a permis à notre laboratoire d'identifier la protéine Nix comme un ligand de TSAP6 (Passer et al., 2003). Nix est une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 transloquée à la mitochondrie lorsqu'elle est activée.

Nix et TSAP6 coopèrent pour induire l'apoptose. En effet, la surexpression de Nix dans les cellules HeLa stablement transfectées avec *tsap6* augmente la proportion de mort cellulaire et de cellules apoptotiques. De même la transfection de Nix dans les cellules 293T induit une mort cellulaire qui est réversée par un siRNA *tsap6* (Passer et al., 2003).

L'effet pro-apoptotique de TSAP6 a été confirmé par les études menées chez le rat où l'apoptose induite par la surexpression de rPHyde s'est avérée dépendante de la Caspase-3. Après la transfection de *pHyde*, les cellules DU145 présentent une augmentation dose- et temps-dépendante de l'activité de la Caspase 3. Un prétraitement (24h avant transfection) par des inhibiteurs spécifiques de la Caspase 3 (peptides DEVD ou VAD) bloque l'activation induite par pHyde et diminue la fragmentation de l'ADN observée dans les cellules transfectées. Certaines cellules ne contenant pas de caspase-3 (MCF7) ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par pHyde (Zhang et al., 2001).

V.6 - TSAP6 et le cycle cellulaire

La surexpression de TSAP6 peut entraîner un blocage du cycle cellulaire.

Les résultats de l'analyse en double hybride en levure ont également mis en évidence l'interaction de TSAP6 avec la protéine kinase Myt1 (Passer et al., 2003) connue pour phosphoryler et ainsi inactiver la protéine régulatrice du passage G2/M : Cdc2.

Les cellules Hela stablement transfectées avec *tsap6* présentent une forte proportion de cellules en G2/M. Ce blocage passe par le maintient de la protéine Myt1 dans une forme hypophosphorylée active (Passer et al., 2003) inhibant l'activité de Cdc2.

De plus, la surexpression de rPHyde entraîne l'inhibition de croissance de cellules tumorales de prostate ou de sein (Steiner et al., 2000; Zhang et al., 2001).

Les effets pro-apoptotique et anti-prolifératif de TSAP6 sont cohérents avec ses fonctions d'effecteur de P53 et de protéine impliquée dans la réversion tumorale.

V.7 - TSAP6 et la sécrétion

Notre équipe a également montré que TSAP6 induit la sécrétion de TCTP (Amzallag et al., 2004). TCTP est une protéine exprimée dans de nombreux types cellulaires, surexprimée dans de nombreux cancers, et qui a été montrée comme importante dans le phénomène de réversion tumorale (Tuynder et al., 2002; Tuynder et al., 2004) (voir I.2 - page 13). Elle a été décrite comme une protéine sécrétée et pouvant stimuler le relargage d'histamine, c'est pourquoi elle est aussi appelée HRF : *Histamine Releasing Factor* (MacDonald et al., 1995). Mais sa sécrétion ne passe pas par la voie classique ER-Golgi. Par contre, TSAP6 et TCTP sont présentes dans les exosomes, vésicules issues d'une sécrétion non-classique.

La potentialité de TSAP6 à faire sortir de la cellule une molécule anti-apoptotique, TCTP, renforce sa fonction pro-apoptotique.

Dans le but d'approfondir nos connaissances sur la protéine TSAP6 et notamment au niveau fonctionnel, nous l'avons étudié dans des modèles murins.

VI - Caractérisation de la protéine mTSAP6

Bien qu'elle ait été initialement isolée à partir d'un système cellulaire murin (Amson et al., 1996), TSAP6 a surtout été étudiée chez l'humain et le rat.

Nous avons entrepris de caractériser son expression, sa localisation tissulaire, cellulaire et intracellulaire dans des modèles de souris.

VI.1 - Caractérisation biochimique de la protéine

L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement de la protéine TSAP6 a permis de caractériser biochimiquement cette protéine chez la souris. Cet anticorps a été généré par injection d'un peptide spécifique chez le lapin et purifié par affinité contre ce peptide.

MSGEMDKPLISRRLVDSDGS

Nous avons pu montrer sa spécificité en éteignant le signal par des siRNA (résultats non présentés).

VI.1.1 - TSAP6 est une protéine glycosylée in vivo

Tout comme il avait été trouvé chez l'humain (Passer et al., 2003), l'analyse par *Western blot* de l'expression de TSAP6 dans des lysats cellulaires révèle 2 formes distinctes (Figure 22A). Ce doublet est formé d'une bande d'environ 49kDa et une autre de 54kDa. Comme un seul ARNm codant pour TSAP6 n'est détecté en *Northern blot*, ces deux bandes observées en Western Blot et qui sont toutes deux immunoprécipitées par l'anticorps anti TSAP6 doivent résulter de modifications post-traductionnelles.

La forme de 54kDa ne migre pas sous la forme d'une bande nette, mais apparaît plutôt diffuse. Par conséquent, nous avons avancé l'hypothèse d'une glycosylation de la protéine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons tout d'abord traité les cellules à la tunicamycine, un agent inhibant la N-glycosylation. Ce traitement diminue l'intensité de la bande haute en Western blot et augmente celle de la bande à 49kDa (Figure 22B).

Ensuite, nous avons testé l'effet de différentes glycosidases sur le profil d'expression de TSAP6 à partir de lysats protéiques. En présence d'une N-glycosidase, l'intensité de la bande haute décroît fortement du *Western blot*, alors que la bande basse à 49kDa est plus abondante (Figure 22C).

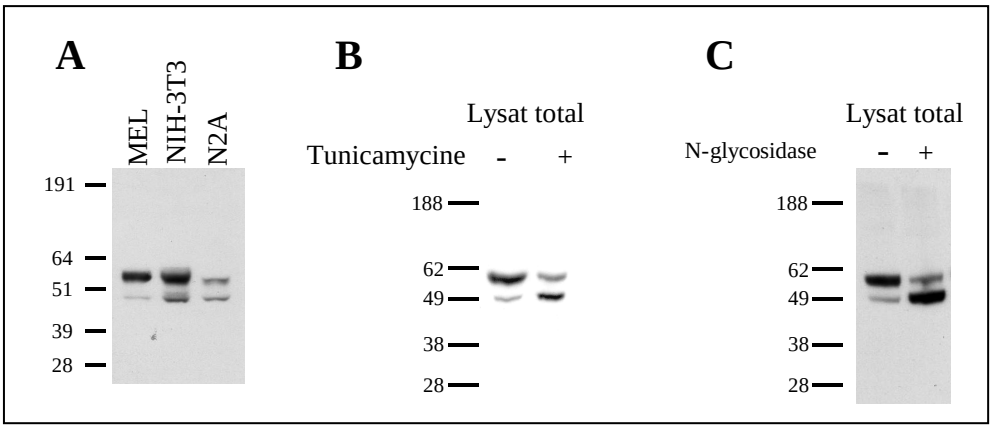


***Figure 22 : Caractérisation de TSAP6 par* Western blot**

Nous avons ainsi montré que la bande basse représente la forme native de TSAP6, et que la bande haute résulte d'une N-glycosylation de la protéine.

Dans les organes que nous avons analysés par Western blot (voir Figure 27 page 86), une troisième bande, vers 60 kDa, est détectée par l'anticorps anti-TSAP6. Nous n'avons pas, pour l'instant, identifié la nature de cette bande, que nous n'avons jamais observé dans les lysats cellulaires.

VI.1.2 - TSAP6 est une protéine à demi-vie courte

De manière à compléter notre étude de la protéine TSAP6, nous avons cherché à déterminer sa demi-vie. Par la technique de pulse chase, nous avons pu estimer la demi-vie de TSAP6 dans les cellules MEL (Mouse Erythro Leukemia) à environ 4h (Figure 23).

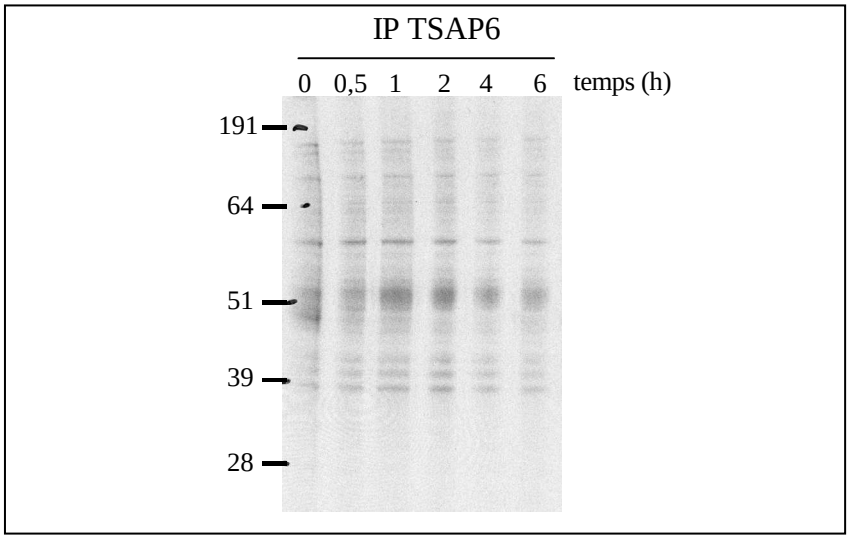


Figure 23 : Détermination de la demi-vie de la protéine TSAP6 par pulse chase

Cette approche nous a par ailleurs permis de montrer que la glycosylation de TSAP6 est un phénomène rapide puisque après 30 min de chasse, on ne détecte plus TSAP6 sous sa forme native mais uniquement sous sa forme glycosylée.

VI.1.3 - TSAP6 peut s'homodimériser

Il a été décrit que TSAP6 contient un site de dimérisation en C-terminal.

Nous avons pu montrer que cette dimérisation est bien possible *in vivo*. En effet en cotransfectant TSAP6-GFP et TSAP6-Flag puis en immunoprécipitant la protéine Flag on récupère de la protéine GFP, ce qui indique que les 2 formes interagissent *in vivo*.

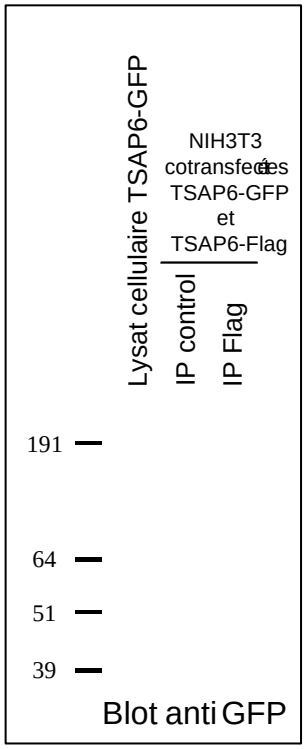
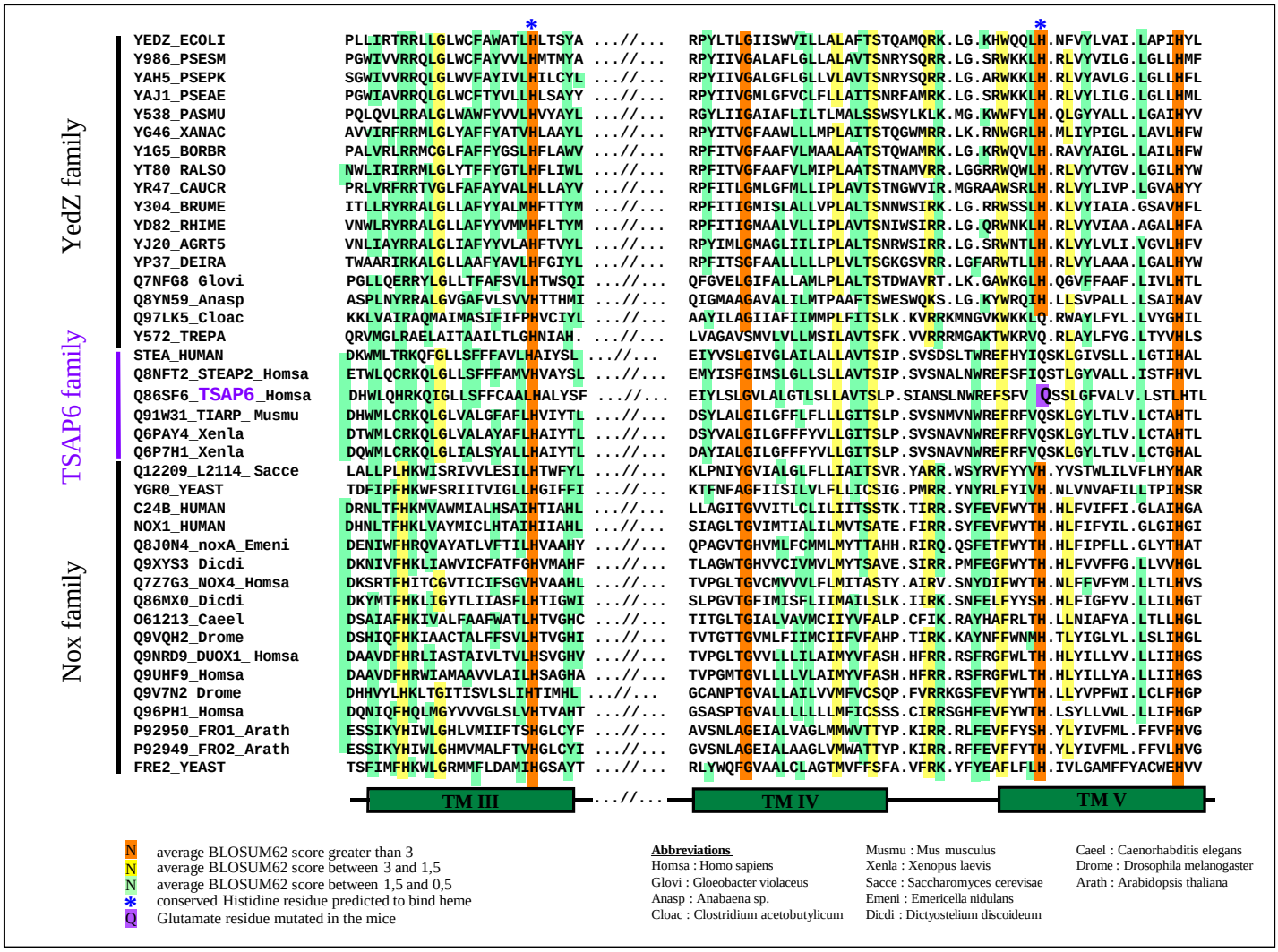


Figure 24 : TSAP6 forme des oligomères

VI.1.4 - <u>TSAP6 et l'hémine</u>

TSAP6 possède (comme les autres membres de la famille) un domaine homologue à celui décrit comme liant l'hème (molécule constitutive de l'hémoglobine) dans les NADH/NADPH oxido-reductases (ex.: YedZ, Nox, …). Ces protéines, qui possèdent, comme TSAP6, 6 domaines transmembranaires, lient l'hème *via* un résidu Histidine très conservé sur les domaines transmembranaires 3 et 5.

Il est frappant de remarquer que, chez tous les homologues connus de TSAP6, un résidu Histidine est également hautement conservé sur les domaines transmembranaires 3 et 5 (*Figure 25). Ces observations suggèrent que TSAP6 pourrait lier l'hème *via* ces résidus (Sanchez-Pulido et al., 2004).



d'après (Sanchez-Pulido et al., 2004)

Figure 25 : Alignement de différents protéines présentant un domaine ACRATA

Nous avons mis en évidence que l'incubation des cellules avec de l'hème ou de l'hémine (forme oxydée de l'hème) entraîne dans différents types cellulaires (cellules leucémiques MEL, ou rénales embryonnaires NIH3T3) l'apparition de formes de TSAP6 de haut poids moléculaire en *Western blot* (Figure 26).

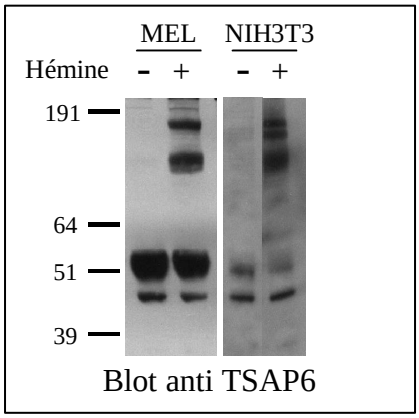


Figure 26 : En présence d'hémine, les cellules contiennent des formes de TSAP6 de haut poids moléculaire

Les formes de haut poids moléculaire observés après traitement des cellules avec l'hémine (sans transfection) pourraient correspondrent à des oligomères de TSAP6. Elles sont immunoprécipitées avec l'anticorps anti-TSAP6 et semblent avoir la taille de 2 ou 3 protéines.

Aucune fonction de TSAP6 n'a pour l'instant été corrélée à la formation de ces oligomères. On peut toute fois noter que dans les réticulocytes, qui contiennent naturellement beaucoup d'hème, ces formes hautes de TSAP6 sont détectées sans que les cellules n'aient subit d'activation.

VI.2 - Localisation de TSAP6 au niveau tissulaire

L'expression de l'ARNm *tsap6* a déjà été décrite dans le cœur, la rate, les poumons, le foie et les muscles squelettiques de souris (Passer et al., 2003) par *Northern blot*.

Nous avons donc voulu compléter cette étude par la caractérisation de l'expression de TSAP6 au niveau protéique par *Western blot* (Figure 27). Nous avons confirmé une forte expression dans les poumons et la rate, mais une expression plus faible dans le foie et le cœur. Nous avons également détecté la présence de TSAP6 dans les glandes surrénales et le pancréas.

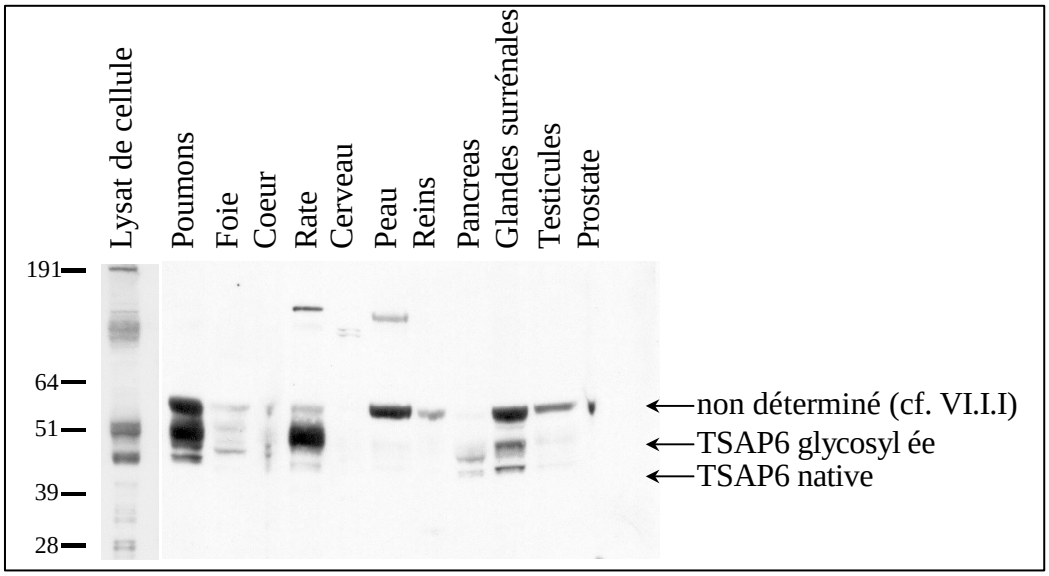


Figure 27 : Etude de l'expression de TSAP6 par* Western blot *sur des organes de souris

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus finement la localisation de TSAP6 dans ces organes. Nous avons pour cela utilisé des techniques d'immunohistochimie en fluorescence sur des coupes d'organes inclus en paraffine. Nous avons ainsi mis en évidence que l'expression de TSAP6 dans les organes analysés est limitée à des structures particulières (Figure 28 : TSAP6 en vert, noyaux en bleu) :

- Dans le foie, un marquage est visible à la membrane plasmique des hépatocytes.

- Dans la rate, TSAP6 n'est exprimée que dans la pulpe rouge, et pas dans la pulpe blanche.
- Dans les reins, la protéine présente une localisation stratifiée dans la medulla, mais dans le cortex elle est majoritairement localisée autour des corpuscules.
- Dans la glande surrénale, l'expression de TSAP6 est limitée à la zone médullaire (aucun marquage dans la zone corticale).
- Dans le pancréas, l'anticorps anti-TSAP6 révèle un marquage de structures particulières dans les zones interlobulaires. Il pourrait s'agir des parois de collagène structurant l'organe.
- Dans les poumons, TSAP6 n'est détectée qu'au niveau des bronches (pas des bronchioles) à la zone apicale des cellules ciliées (marquage dans les cellules contenant de la β-tubuline, protéine spécifique des cils).

L'analyse de la localisation intracellulaire de TSAP6 est en cours.

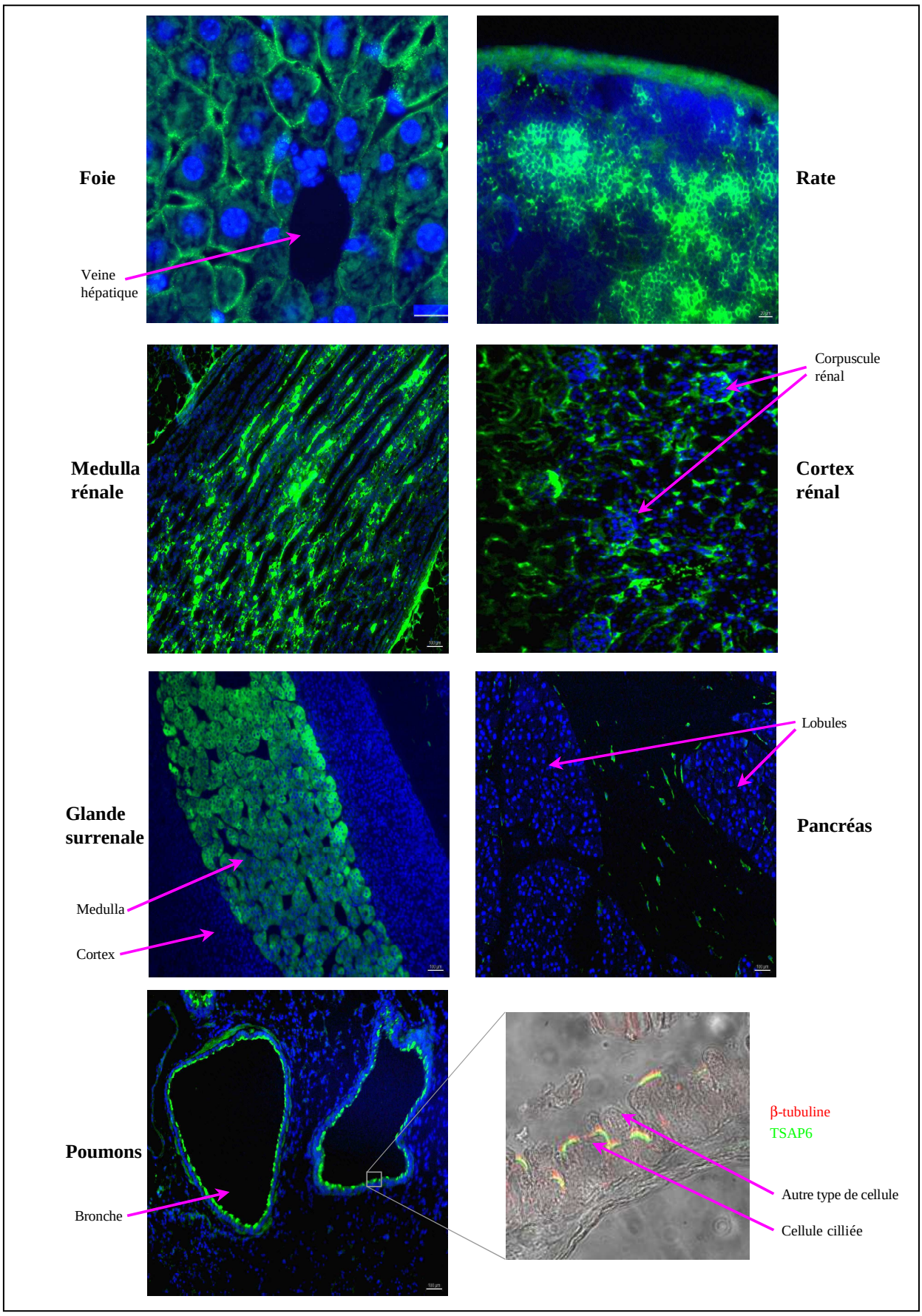


Figure 28 : Analyse immunohistochimique de la localisation de TSAP6 dans différents organes

Après avoir caractérisé l'expression et la nature de la protéine TSAP6, nous avons cherché à mieux comprendre sa fonction dans l'organisme.

VII - Etude de la fonction de la protéine mTSAP6

Dans le but de mieux comprendre la fonction de la protéine mTSAP6, nous avons caractérisé des souris portant une mutation ponctuelle dans le gène *tsap6*. La comparaison de ces souris avec les souris KO *tsap6* que nous sommes en train de générer pourra permettre d'affiner notre compréhension des mécanismes faisant intervenir TSAP6.

VII.1 - Des souris mutantes pour *tsap6* présentent des anomalies pulmonaires et sanguines

VII.1.1 - Génération des souris mutantes

La mutagénèse est induite par 3 injections intrapéritonéales de nitrosourée (ENU) dans des souris mâles C3HeB/FeJ âgées de 10 à 14 semaines. Cet agent chimique induit des mutations aléatoires dans les spermatogonies. Les souris sont ensuite croisées avec des femelles sauvages. Les mutations dominantes sont observées dans les souris de génération F1 et les mutations récessives dans les générations suivantes (Hrabe de Angelis et al., 2000). Les souris ayant un phénotype intéressant sont alors sélectionnées.

Une fois ces souris sélectionnées, l'identification du gène muté est effectuée par localisation chromosomique. Une cartographie de marqueurs polymorphiques entre C3HeB/FeJ et C57Bl/6JIco a été établie tout au long du génome avec un espacement inférieur à 20cM. La région contenant le gène muté est identifiée par analyse de ségrégation entre les marqueurs et le phénotype. Les gènes candidats de cette région sont ensuite séquencés afin d'identifier lequel porte la mutation.

La caractérisation d'une des souris présentant des anomalies sanguines a révélé qu'elle portait une mutation dans le gène *tsap6*. Cette mutation d'un seul nucléotide dans tout le génome se trouve sur le premier nucléotide du dernier codon du 3ème exon du gène *tsap6* (Figure 29). Cette mutation n'affecte pas l'épissage de l'intron qui suit, mais au niveau protéique induit le remplacement d'une Glutamine par une Lysine.

***Figure 29 : La mutation Gln-395-Lys dans le gène* tsap6**

Il est intéressant de noter que la mutation se trouve dans le 5ème domaine transmembranaire et surtout touche un des acides aminés (Q395) les plus conservés du domaine ACRATA (voir Figure 18).

Les protéines portant ce domaine ACRATA ont toutes une Histidine au niveau de ce résidu, sauf les protéines de la famille TSAP6 qui ont une glutamine. La mutation de ce résidu Q395 en Lysine fait que la protéine TSAP6 mutée se "rapproche" des protéines oxydo-réductases portant une Histidine à ce niveau de leur domaine ACRATA. En effet, Histidine et Lysine font toutes deux partie de la famille des acides aminés polaires chargés négativement, alors que la Glutamine de la famille TSAP6 est un acide aminé non chargé.

VII.1.2 - Analyse des phénotypes des souris TSAP6 mutantes Gln-395-Lys

Les souris ont été sélectionnées car elles présentent un phénotype sanguin particulier : les globules rouges des souris mutantes sont plus petits (**microcytose**) et plus nombreux (**érythrocytose** ou polycythémie) que ceux des souris WT.

Une analyse phénotypique standard a ensuite été réalisée sur ces souris :

- contrôle du poids des souris : cette étude a révélé que les femelles mutantes ont un poids total inférieur aux souris sauvage.
- analyses biochimiques : les souris mutantes présentent une augmentation des taux plasmatiques d'urée, d'acide urique et de bicarbonates. Elles ont par contre un niveau de glucose relativement bas.
- observation macroscopique des organes
- contrôle du poids des organes (foie, reins, rate, cœur et graisse viscérale)
- histopathologie

Cette dernière étude a permis de mettre en évidence une nette altération des alvéoles pulmonaires chez les souris mutantes : elles présentent de **l'emphysème**.

Aucune différence de localisation de la protéine à l'intérieur des organes ou des cellules n'a pu être montrée entre les souris WT et mutantes par immunohistochimie ou immunofluorescence.

Les formes oligomériques de TSAP6 sont observées dans les lysats de cellules MEFs (*Mouse Embryo Fibroblasts*) incubées avec de l'hémine qu'elles soient sauvages ou mutantes (résultats non présentés).

VII.1.3 - Les anomalies sanguines dans les souris mutantes

VII.1.3.1 - Quelques notions sur microcytose et érythrocytose

La microcytose définit une taille anormalement petite des globules rouges. Elle est souvent liée à l'érythrocytose (ou polycythemie) qui est caractérisée par un nombre anormalement élevé d'érythrocytes. Quand les deux anomalies sont couplées, l'hématocrite est normale puisque les deux effets se compensent.

La cause majeure d'apparition d'une microcytose+polycythemie (sans anémie) est un déficit relatif en fer. D'autres formes sont des conséquences d'une β- ou une α-thalassémie.

Il existe un modèle animal de microcytose : les souris KO pour *pim-1* (Laird et al., 1993) ; mais elles ne présentent pas d'érythrocytose. A l'inverse, les souris surexprimant Pim-1 présentent une macrocytose. Sen et coll. ont suggéré que l'érythropoïétine pouvait être responsable de l'érythrocytose/microcytose dans certaines souris (Sen et al., 1972).

VII.1.3.2 - Analyse des anomalies sanguines dans les souris mutantes

Les analyses du sang total ont montré que

- le nombre de réticulocytes (précurseurs des érythrocytes) est normal
- les cellules ne présentent pas de fragilité osmotique
- la demi-vie des érythrocytes est normale
- le contenu du foie en fer est normal
- le métabolisme du fer est normal (transport, utilisation, réutilisation)
- la capacité de liaison de la transferrine est normale
- la taille des globules rouges est significativement diminuée dans les souris mutantes
- le nombre de globules rouges est statistiquement augmenté

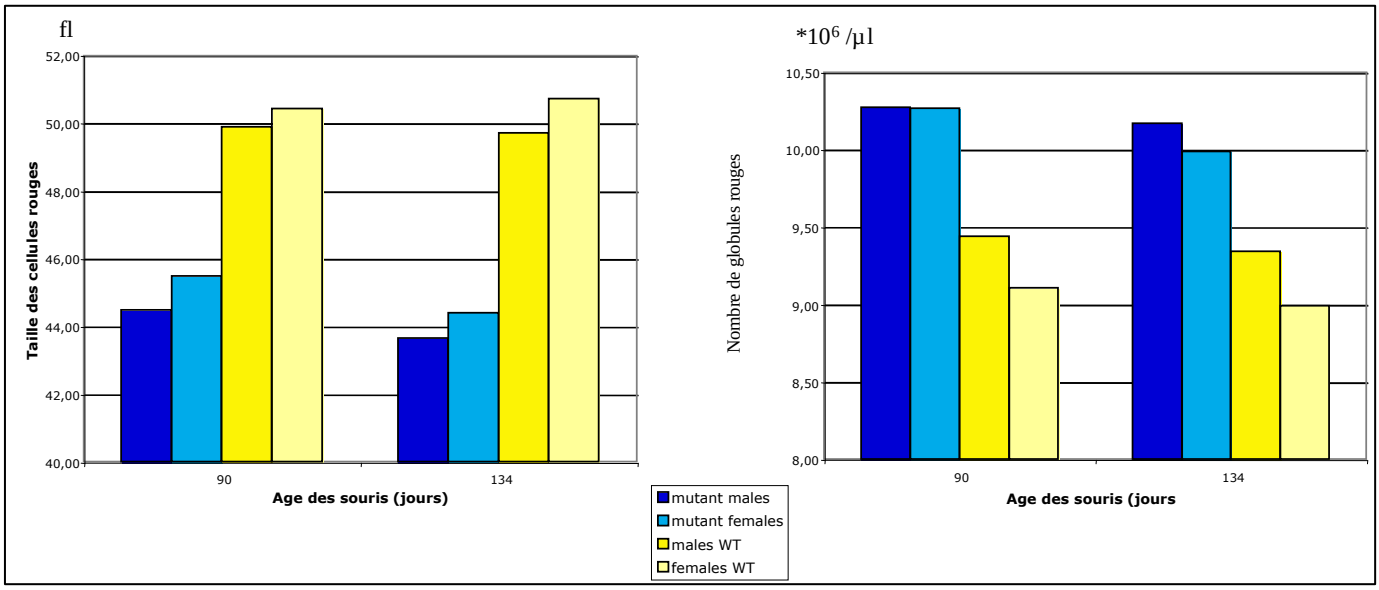


Figure 30 : Les souris mutantes présentent de la microcytose et de l'érythrocytose

La microcytose et l'érythrocytose ont été caractérisées sur le sang total. Comme les érythrocytes représentent la très grande majorité des cellules détectées, les autres types cellulaires sont négligeables dans ce type d'analyse. Ces 2 phénotypes sont donc attribués aux érythrocytes uniquement.

Nous avons voulu vérifier si les précurseurs des érythrocytes (réticulocytes) n'étaient pas déjà affectés. Pour cela nous avons augmenté la proportion de réticulocytes dans le sang en induisant une anémie puis en laissant la population de globules rouges se reformer. Les types cellulaires sont séparés selon leur densité, par centrifugation sur gradient de Percoll

(Vidal and Stahl, 1993). Plus les cellules sont matures plus elles sont denses. Les cellules de la phase supérieure (Phase I) sont considérées comme étant des réticulocytes, celles de la phase II des érythrocytes (au fond du tubes se trouvent les érythrocytes matures). L'efficacité de la purification a été vérifiée par analyse de l'expression du récepteur à la transferrine, dont la quantité diminue avec la maturation des cellules.

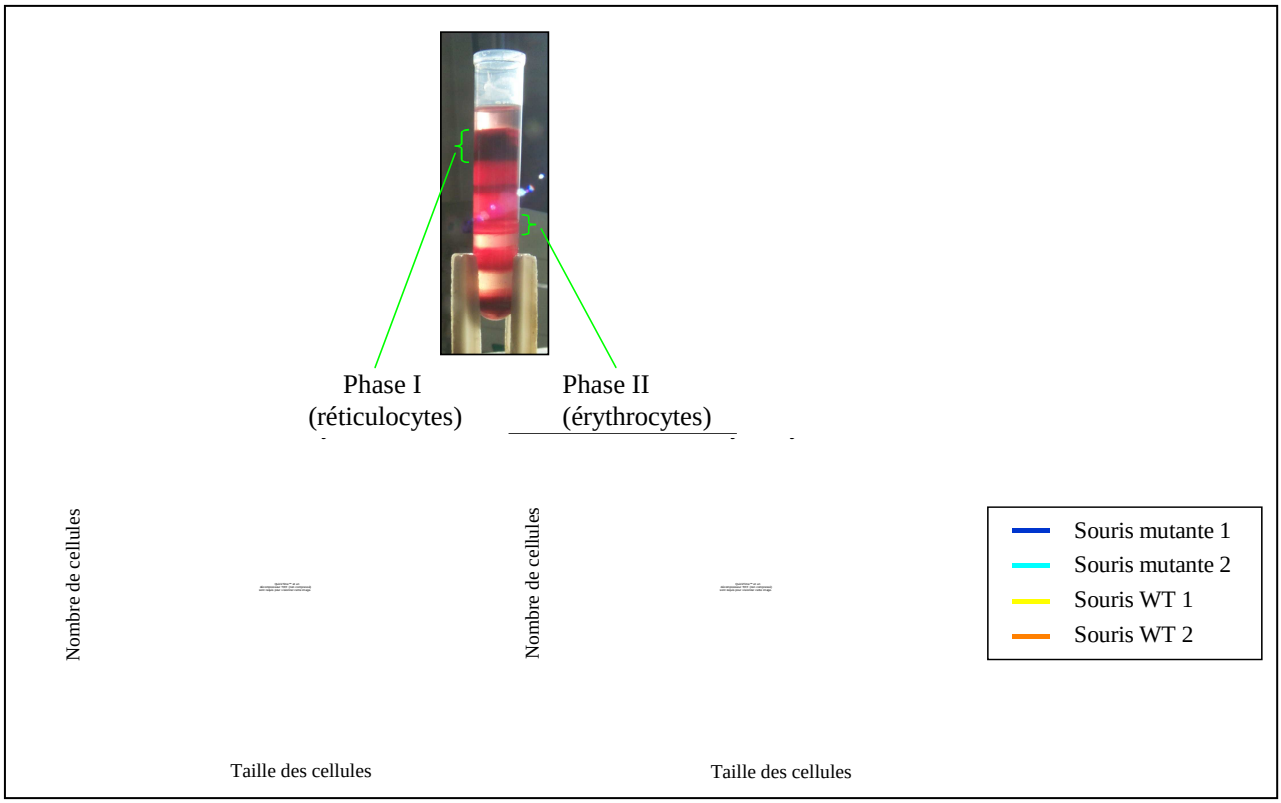


Figure 31 : Analyse de la taille des réticulocytes et érythrocytes par cytométrie de flux

L'analyse de leur taille par Cytométrie de flux a confirmé la microcytose des érythrocytes mais a en plus permis de montrer que les réticulocytes des souris mutantes étaient également plus petits que ceux des souris WT (Figure 31).

Ces résultats montrent que la microcytose est due à une perturbation affectant les globules rouges, déjà au niveau des réticulocytes. D'autres expériences devront être menées pour savoir si les stades encore plus précoces de l'érythropoïèse sont également touchés.

VII.1.4 - <u>L'emphysème dans les souris mutantes</u>

VII.1.4.1 - <u>Quelques notions sur l'emphysème</u>

L'emphysème est une maladie affectant les alvéoles pulmonaires. Elle est caractérisée par la dilatation des alvéoles pulmonaires causée par l'altération de leurs parois élastiques. Ceci est dû à une dérégulation de la balance protéase/antiprotéase qui contrôle l'épaisseur de la matrice extracellulaire au niveau des alvéoles pulmonaires. La destruction du collagène

interstitiel est une caractéristique de différents modèles murins d'emphysème (pour revue voir (Foronjy and D'Armiento, 2001), (Brusselle et al., 2005)) et des anticorps anti-collagène ont été trouvés chez des patients emphysémateux (Michaeli and Fudenberg, 1974). Pourtant une étude a montré une augmentation du niveau de collagène dans les régions septales des poumons de personnes présentant de l'emphysème (Cardoso et al., 1993).

L'intégrité des parois des alvéoles pulmonaires est donc due à une régulation fine de la balance entre synthèse et dégradation des composants de la matrice extracellulaire.

L'apparition de l'emphysème est, chez l'homme, majoritairement une conséquence du tabagisme. L'inflammation engendrée par la fumée de cigarette active les macrophages qui sécrètent entre autres des protéases et antiprotéases.

L'emphysème peut également avoir une origine génétique. En effet, des mutations entraînant une mauvaise expression, sécrétion ou fonction de l'α1-antitrypsine peuvent engendrer cette maladie (Laurell, 1963; DeMeo and Silverman, 2004). Cette enzyme est sécrétée par le foie et agit au niveau des poumons où elle régule l'épaisseur de la matrice extracellulaire en dégradant diverses protéases (trypsine, élastase, chimotrypsine).

Chez la souris, un modèle d'emphysème a également été obtenu par délétion du gène *smad3* (Bonniaud et al., 2004). Ce phénotype a été corrélé à la surexpression des métalloprotéases MMP9 et MMP12. De plus, la surexpression de la MMP1 humaine dans des poumons de souris induit le développement d'un emphysème (D'Armiento et al., 1992).

Les souris KO pour MMP12 sont, quant à elles, plus résistantes à l'induction de l'emphysème par la fumée de cigarette que ne le sont les souris WT (Hautamaki et al., 1997).

Une autre hypothèse a également été décrite par Kasahara et col. pour expliquer l'apparition de l'emphysème. Ils ont montré que VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*) et VEGF-R2 (son récepteur) sont moins exprimés dans les poumons emphysémateux (Kasahara et al., 2001). La perte de ces facteurs, permettant la survie des cellules endothéliales, entraînerait la mort de ces cellules par apoptose (Kasahara et al., 2000; Taraseviciene-Stewart et al., 2001; Tuder et al., 2003) et donc la diminution des vaisseaux dans les parois des poumons de patients souffrant d'emphysème (Liebow, 1959).

Un autre modèle de souris présentant une sensibilité accrue à la fumée de cigarette a été décrit dans des KO pour le facteur de transcription NRF2 (Rangasamy et al., 2004). Cette observation a été corrélée à une apoptose accrue des cellules pulmonaires. Des études récentes ont confirmé qu'une apoptose (induite par les céramides) des cellules pulmonaires pouvait entraîner l'apparition d'emphysème (Petrache et al., 2005).

Certaines formes d'emphysème présentent une inflammation qui favorise le dérèglement des protéases/antiprotéases et des cytokines. Ainsi, une augmentation de l'interleukine-13 et du TNFα ont été corrélés à l'emphysème (Boutten et al., 2004).

Notons enfin que les fibroblastes issus de poumons atteints d'emphysème présentent un temps de doublement allongé par rapport à celui des fibroblastes provenant de personnes saines (Holz et al., 2004). Ceci suggère, qu'en plus d'une dérégulation de l'apoptose, les cellules des poumons emphysémateux présentent des troubles de la prolifération.

VII.1.4.2 - Analyse du phénotype pulmonaire des souris mutantes

Les alvéoles pulmonaires des souris mutantes présentent un net élargissement mais aucune inflammation n'a été détectée (Figure 32). Il a déjà été noté que les souris C3H peuvent développer de l'emphysème sans présenter d'inflammation pulmonaire, car elles ne possèdent pas le principal récepteur au LPS.

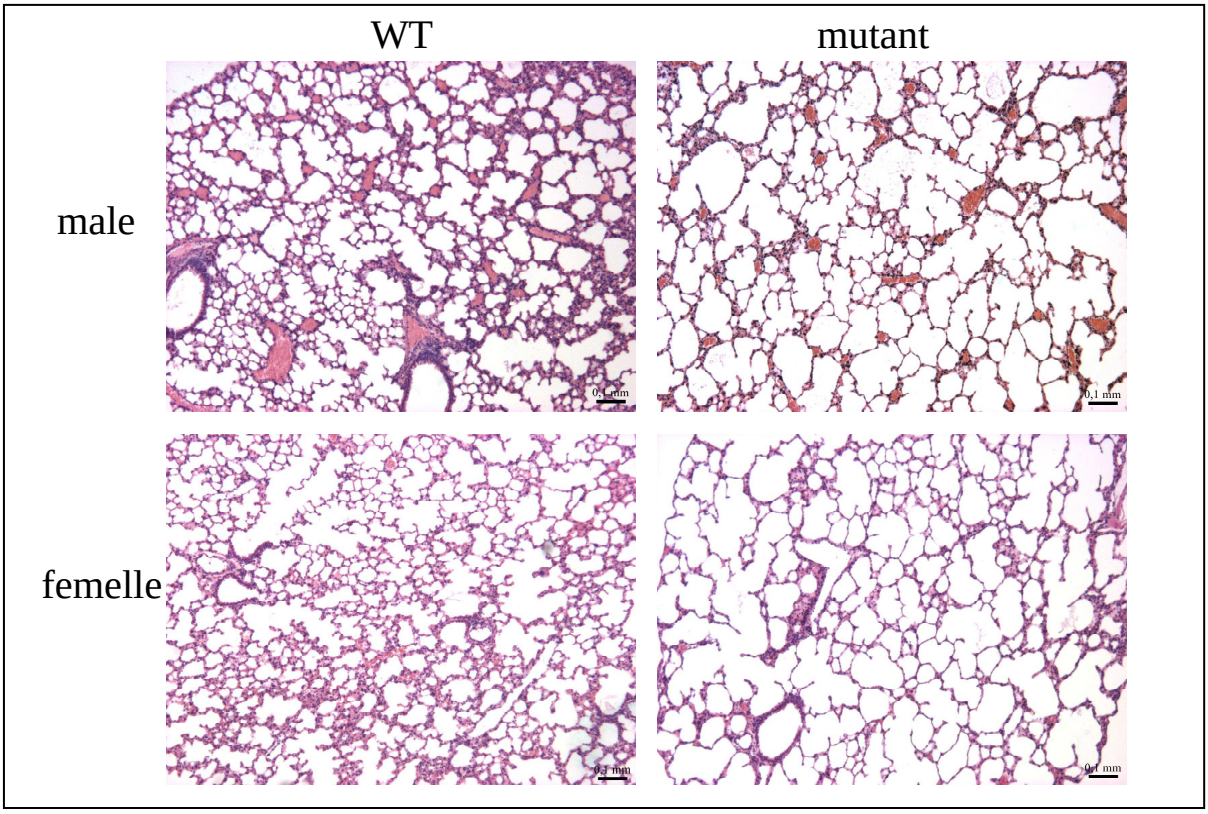


Figure 32 : Histopathologie montrant un net emphysème pulmonaire dans les souris* tsap6 *mutantes

Afin de comprendre les mécanismes ayant engendré ce phénotype dans les souris, nous avons cherché à savoir s'il était associé à une différence d'expression, de localisation ou d'activité de la protéine TSAP6.

Les premières analyses par *Western blot* dans les poumons indiquent que TSAP6 serait moins exprimé dans les souris mutantes que dans les souris sauvages, et ce chez les mâles comme les femelles (Figure 33). Ces résultats devront être confirmés sur d'autres souris.

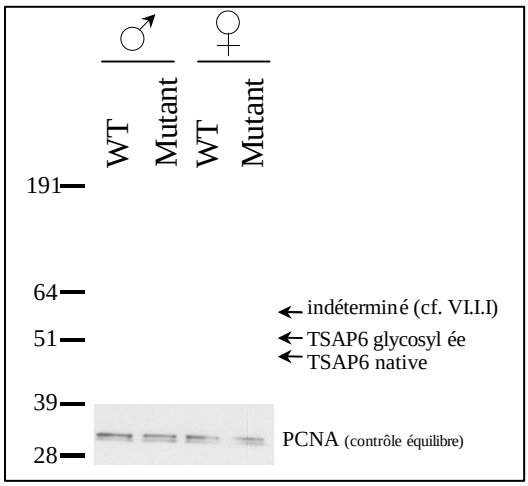


Figure 33 : Analyse par Western blot de l'expression de TSAP6 dans les poumons

Comme l'emphysème peut être dû à un déficit de sécrétion d'une protéine hépatique (voir plus haut), et puisque des travaux de notre laboratoire ont montré que TSAP6 induit la sécrétion d'au moins une protéine, nous avons voulu savoir si la mutation affectait l'expression et surtout la capacité de TSAP6 à promouvoir la sécrétion dans cet organe.

Nous avons commencé par regarder l'expression de TSAP6 dans le foie. Aucune différence significative n'a pour l'instant été mise en évidence chez les femelles, mais chez les mâles il y aurait moins de TSAP6 dans les mutants que dans les souris WT (Figure 34).

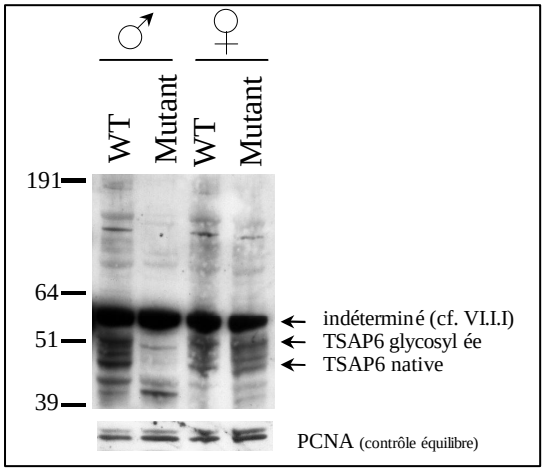


Figure 34 : Analyse par Western blot de l'expression de TSAP6 dans le foie

Ce résultat est confirmé par immunohistochimie sur des coupes de foie, bien que cette technique soit moins sensible et peu quantitative.

Des expériences d'immunofluorescence sur des hépatocytes primaires isolés des souris WT et mutantes ont permis de montrer qu'aucune différence de localisation intracellulaire de TSAP6 n'est induite par la mutation.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si la mutation de TSAP6 pouvait affecter la sécrétion de l'α1-antitrypsine. Pour cela, nous avons analysé l'expression de cette protéine dans le foie et les poumons par *Western blot* ; si aucune différence d'expression n'a pu être mise en évidence dans les poumons, il semble que le foie des souris mâles mutantes (mais pas des femelles) contienne plus d'α1-antitrypsine que dans les souris mâles sauvages (résultats non présentés). Ceci pourrait être cohérent avec un déficit de sécrétion puisque l'on retrouve plus de protéine dans le lysat cellulaire.

La sécrétion de cette antiprotéase par des cellules MEFs sauvages et mutantes à été comparée. Elle n'a révélé aucune différence significative.

Comme nous l'avons vu, une des fonctions de TSAP6 est de s'associer à TCTP et surtout d'induire sa sécrétion (Amzallag et al., 2004). Or, il a été montré que TCTP est surexprimé dans les poumons de personnes souffrant d'emphysème par rapport à des personnes non (ou faiblement) atteintes (Spira et al., 2004). De plus, TCTP a été décrit comme pouvant à son tour induire la sécrétion de l'IL-13 ; or celle-ci voit son expression nettement diminuée chez des patients présentant certains types d'emphysème (Boutten et al., 2004).

Nous avons donc analysé l'expression de la protéine TCTP dans les poumons et le foie des souris sauvages et mutantes ainsi que son niveau de sécrétion les hépatocytes et cellules MEFs.

Les études préliminaires ne montrent pas de différence significative d'expression de TCTP dans les foies ni les poumons entre les souris WT et mutantes. D'autre part, l'analyse de la sécrétion de TCTP dans des cellules MEFs issues d'embryons WT et mutants a montré ,dans certains clones, une augmentation de la sécrétion de TCTP par rapports aux clones sauvages (résultats non présentés). De la même façon, lors de l'analyse de la sécrétion de TCTP par des hépatocytes primaires, nous avons détecté une sécrétion accrue de TCTP dans certains des hépatocytes mutants (résultats non présentés).

Il est à noter que le phénotype emphysémateux n'a pas été trouvé dans 100% des souris mutantes, il est possible que la sécrétion de TCTP ne soit pas affectée dans tous les clones (MEFs ou hépatocytes). Il conviendrait de répéter ces expériences sur un plus grand nombre d'échantillons, de manière à obtenir des résultats statistiquement interprétables quant à l'effet de la mutation de TSAP6 sur la sécrétion de TCTP.

VII.1.5 - Perspectives

VII.1.5.1 - Une piste pour expliquer le phénotype sanguin

Parmi les partenaires de TSAP6 identifiés par notre laboratoire se trouve Nix (Passer et al., 2003). Or l'expression de l'ARNm *nix* augmente lors de la maturation des précurseurs érythrocytaires suite à un traitement par le facteur de croissance érythropoïétique: l'érythropoïétine (Aerbajinai et al., 2003).

Par conséquent, il sera intéressant d'étudier le niveau d'expression de Nix dans les cellules sanguines ainsi que son interaction avec TSAP6 et de voir si un déficit de la quantité ou de la fonction de Nix peut entraîner un défaut d'érythropoïèse conduisant aux phénotypes de microcytose et d'érythrocytose.

VII.1.5.2 - Plusieurs pistes pour expliquer l'emphysème pulmonaire

Nous prévoyons de confirmer les différences d'expression des protéines TSAP6, TCTP et α1-antitrypsine observées dans les poumons et les foies en analysant un plus grand nombre de souris.

Si la baisse du niveau de TSAP6 est confirmée dans différents organes, nous tenterons de déterminer si la mutation affecte la demi-vie de la protéine.

De la même façon que TCTP, un autre partenaire de TSAP6, Nix, a été retrouvé surexprimé dans les poumons de patients emphysémateux (Spira et al., 2004). Nix et TSAP6 coopèrent pour induire l'apoptose (Passer et al., 2003). Or différents modèles d'emphysème montrent une apoptose accrue au niveau des poumons. Il nous faudra donc vérifier le niveau d'expression de Nix dans les poumons des souris mutantes.

Pour TCTP comme pour Nix, des études sont en cours de façon à vérifier si la mutation n'affecte pas leur interaction avec TSAP6.

Différentes hypothèses peuvent permettre d'expliquer l'apparition de l'emphysème dans les souris mutantes. La mutation Gln→Lys de TSAP6 peut potentiellement entraîner une perte comme un gain de fonction pour la protéine.

Nous pensons que, comme cela a été décrit pour d'autres modèles d'emphysème, le phénotype que nous observons pourrait être dû à une augmentation du processus apoptotique. La mutation induirait donc un "gain de fonction" pour l'activité pro-apoptotique de TSAP6.

Si la mutation de TSAP6 induit une augmentation de la fonction pro-apoptotique de Nix, de la capacité de TSAP6 à sécréter la protéine anti-apoptotique TCTP, l'accroissement de l'apoptose apparaît comme une conséquence logique de cette mutation.

VII.1.5.3 - Corrélations entre les phénotypes

La mutation de TSAP6 a des effets à la fois sur la taille et le nombre des globules rouges. Mais l'un des deux phénotypes sanguins ne pourrait-il pas être la conséquence de l'autre ?

En effet, on sait que, d'une façon générale, il est nécessaire que la quantité d'oxygène transporté par le sang reste identique pour éviter une anémie. Cette quantité est relative à la quantité d'hémoglobine dans les cellules puisque c'est elle qui transporte l'oxygène.

On pourrait imaginer que la mutation ne perturbe que la taille des globules rouges et pas directement leur nombre. Afin de compenser le manque en oxygène (dû au fait que les cellules des souris mutantes sont plus petites, et contiennent moins d'hémoglobine), l'organisme produirait les érythrocytes en plus grand nombre. L'enchaînement inverse est également envisageable. Ces hypothèses restent à être vérifiées.

En outre, on peut émettre l'hypothèse que le phénotype au niveau des cellules sanguines ne serait qu'une conséquence du phénotype pulmonaire. En effet, on sait que l'emphysème entraîne une perturbation de la fonction pulmonaire d'absorption de l'oxygène. Or, il a été décrit qu'il existe une corrélation entre la quantité de globules rouges et la concentration en oxygène dans le sang (Vanier et al., 1963), et qu'une hypoxémie (faible quantité d'oxygène dans le sang) pouvait entraîner une polycythémie (Cournand, 1950). De plus, l'administration d'oxygène à des patients hypoxiques permet de rétablir un hématocrite et un volume des globules rouges normal (Chamberlain and Millard, 1963).

En accord avec cette hypothèse, plusieurs articles décrivent que dans de rares cas l'emphysème peut entraîner diverses complications dont une érythrocytose (Freedman and Penington, 1963; Herbert et al., 1964; Segel and Bishop, 1966).

Mais, comme les souris TSAP6 mutantes présentent un hématocrite normal (puisque la microcytose compense l'érythrocytose), ce phénomène de correction ne semble pas pouvoir expliquer leur phénotype sanguin.

Enfin, nous avons pu trouver dans la littérature qu'un type particulier de facteur de transcription est impliqué à la fois dans des mécanismes de l'érythropoïèse et dans l'emphysème.

Les facteurs de transcription Nf-E2 et NrF2 (*Nfe2l2 nuclear factor erythroid derived 2, like 2*) sont des protéines très similaires qui induisent l'expression de gènes impliqués dans l'érythropoïèse dont celui codant la *β-globine*, un élément majeur pour la fonction de transport de l'oxygène par les érythrocytes (Ney et al., 1990; Moi et al., 1994; Kotkow and Orkin, 1995).

Il est important de noter que NrF2 protège les souris contre l'apparition de l'emphysème suite à l'exposition à la fumée de cigarette (Rangasamy et al., 2004) et qu'en plus une mutation Val-173-Ala de Nf-E2 est corrélée avec l'apparition d'une microcytose (Peters et al., 1993).

En outre, l'hémine peut participer à l'induction de ces facteurs de transcription. Or, c'est un produit d'oxydation de l'hème (qui a été supposé pouvoir se lier à TSAP6 (Sanchez-Pulido et al., 2004)) et, comme nous avons montré plus haut, elle peut jouer sur l'oligomérisation de la protéine TSAP6 (VI.1.3 - page 83).

De plus, Nrf2 et NFE2 peuvent activer la transcription du gène codant pour l'aldo-keto reductase 1 (AKR1B3) (Nishinaka and Yabe-Nishimura, 2005). Or, le criblage en double

hybride réalisé dans le but d'identifier les partenaires de TSAP6 a révélé AKR1B3 comme pouvant être un ligand potentiel (résultats non publiés). Enfin, différents ARNm codants pour des aldo-keto reductases ont été trouvé surexprimés dans les souris exposées à la fumée de cigarette et chez des fumeurs atteints d'emphysème (Hackett et al., 2003; Rangasamy et al., 2004).

Les phénotypes sanguins et pulmonaires semblent pouvoir être liés au niveau moléculaire puisque plusieurs protéines pourraient avoir des rôles à la fois dans les mécanismes d'érythropoïèse et d'emphysème. De plus l'hémine, qui est un ligand potentiel de TSAP6, semblerait avoir un rôle central permettant de relier TSAP6, NrF2/NfE2, AKR1B3 et les phénotypes.

L'effet de la mutation de* tsap6 *sur son interaction avec AKR1B3 ou l'hémine, et sur la fonction de Nrf2 sont donc des voies que nous devrons explorer pour tenter d'expliquer et éventuellement de corréler les deux phénotypes.

Une étude approfondie de ces souris nous permettra peut-être de détecter de nouveaux phénotypes dus à la mutation de* tsap6*, et ainsi d'investiguer de nouvelles fonctions de la protéine.

Nous savons déjà que les croisements entre souris hétérozygotes engendrent des souris dont la répartition génotypique ne suit pas les lois de Mendel. Il est intéressant de noter que cette même observation a été faite dans les souris KO pour l'isoforme PI2 de l'α1-antitrypsine.

En raison de la nature de la mutation par rapport au consensus ACRATA et des fonctions prédites pour TSAP6. Il sera important de vérifier si TSAP6 est capable de lier l'hème et d'avoir une activité oxydo-reductase et il faudra déterminer si ces fonctions sont altérées par la mutation.

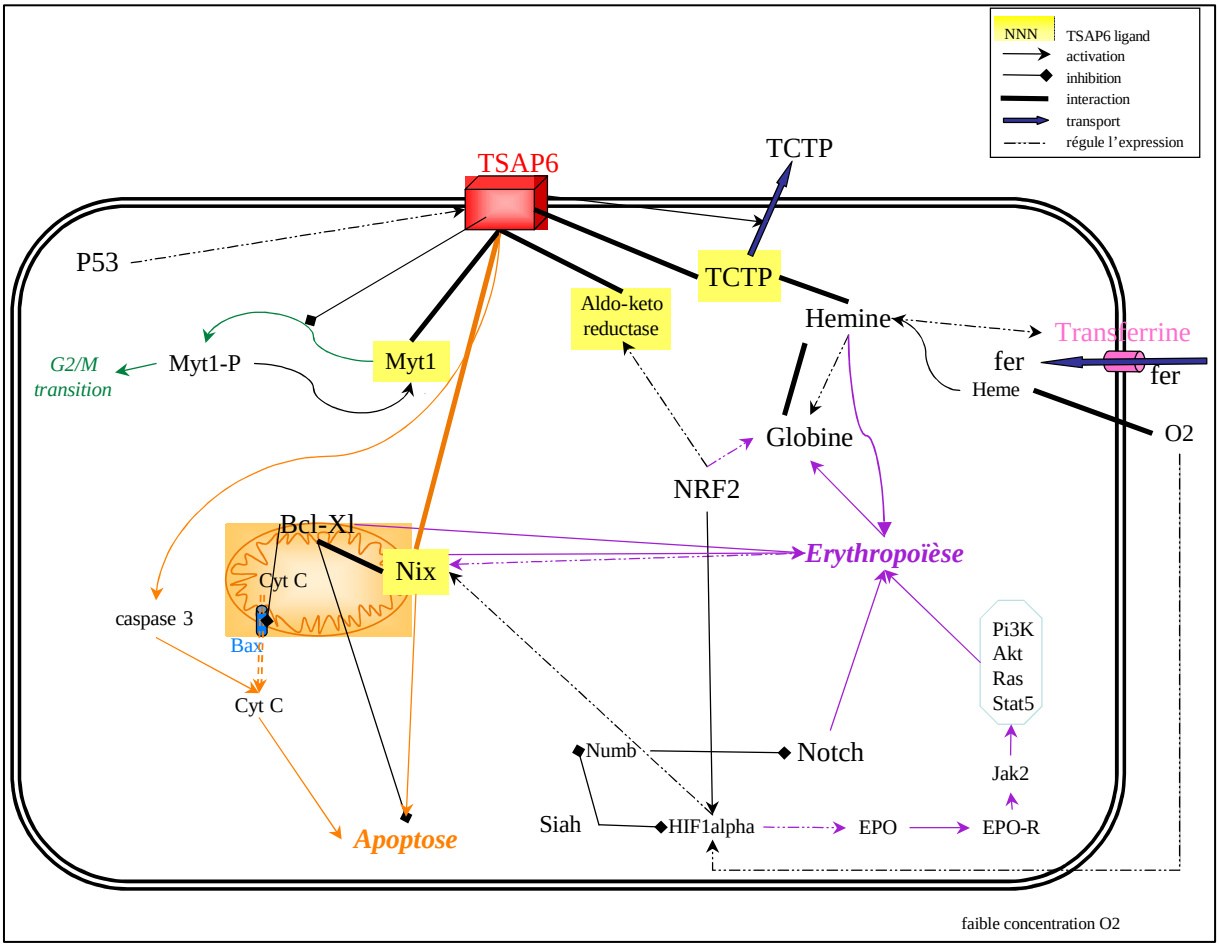


Figure 35 : TSAP6 et ses partenaires

VII.2 - Génération de souris KO pour *tsap6*

Dans le but de compléter notre étude fonctionnelle de la protéine TSAP6, nous avons entrepris en parallèle la génération de souris KO.

Il sera intéressant de rechercher si les phénotypes observés dans les souris mutantes se retrouvent dans les souris KO. Si les souris KO ne présentent pas d'élargissement des alvéoles pulmonaires, cela tendrait à confirmer notre hypothèse selon laquelle la mutation Gln395→Lys est un gain de fonction. En revanche si les souris KO présentent de l'emphysème, on pourra conclure que la mutation correspond à une perte de fonction de la protéine.

VII.2.1 - Le KO *tsap6*

Le gène *tsap6* comportant de très longs introns, il nous était impossible de déléter la totalité du gène. Nous avons choisi de déléter 2 des 5 exons : les exons 2 et 3.

Il était impossible de déléter l'exon 1 en plus de l'exon 2 car ils sont séparés par 26kb. Et comme l'exon 2 contient un ATG en phase, il était impossible de ne supprimer que le 1er exon.

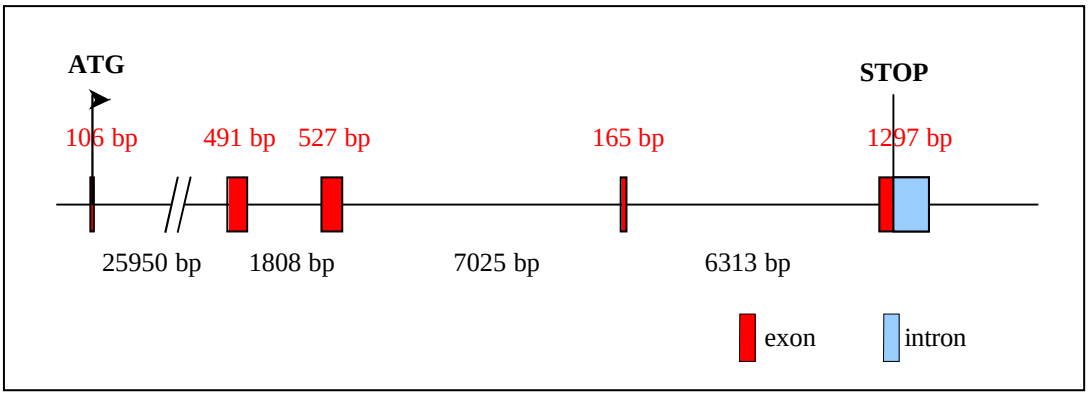


***Figure 36 : Structure du gène* tsap6**

VII.2.2 - La construction

De la même façon que pour *siah-1b*, une amplification par PCR grâce à une Taq polymérase très fidèle nous a permis d'amplifier les 9,8kb d'ADN génomique du chromosome 1 contenant la partie du gène *tsap6* que nous souhaitions éliminer.

Nous avons inséré des sites de restriction à chaque extrémité de ce produit d'amplification afin de le cloner dans un vecteur pBluescript (pBS).

Nous avons tiré profit de sites de restriction uniques présents sur l'ADN génomique : SpeI et XbaI pour insérer un site loxP en 5' de la zone à invalider et une cassette néomycine entourée par 2 sites loxP de l'autre côté de la zone à éliminer (Figure 37).

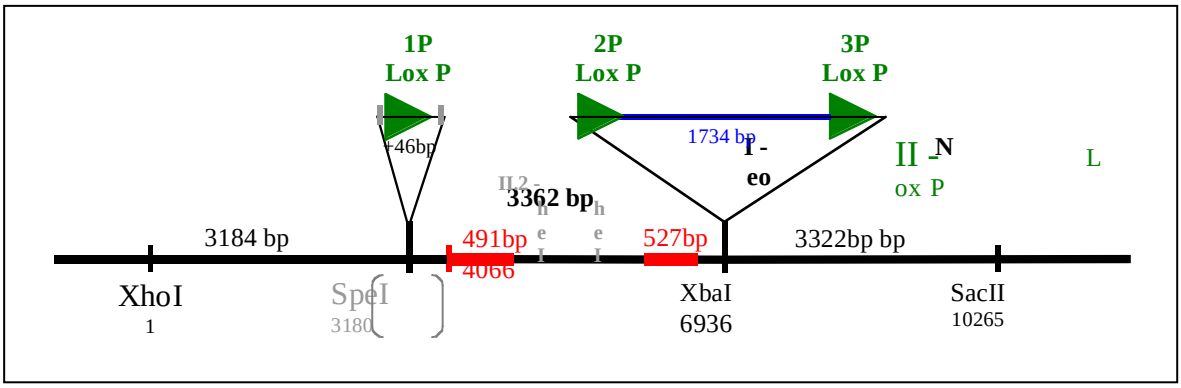


***Figure 37 : Construction pour le KO* tsap6**

Après avoir inséré dans le vecteur pBS le produit de PCR contenant les exons 2 et 3 de *tsap6* dans lequel nous avons inséré les sites LoxP et la cassette NEO, nous avons injecté cette construction dans les cellules ES de nos souris.

Les cellules ayant sur leur chromosome 1 les 2 sites LoxP P1 et P2 (mais pas la cassette NEO) sont injectées dans des blastocystes de souris eux mêmes introduits dans des souris gestantes. Il faut ensuite sélectionner les souris qui ont intégré la construction dans leurs cellules germinales et peuvent ainsi la transmettre à leur descendance. Les souris issues du croisement entre 2 chimères comportant la construction dans leurs cellules germinales contiennent la construction dans toutes leurs cellules.

Elles sont alors croisées avec des souris exprimant la protéine CRE (Figure 17 page 71) dans toutes les cellules (génération d'un KO total) ou dans un type particulier de cellules (promoteur spécifique), ou à un instant donné, ce qui permet la génération d'un KO conditionnel en localisation ou en temps.

Nous savons pour l'instant que ces souris sont viables, mais leur étude phénotypique n'a pas encore commencé à ce jour.

Pour savoir si la microcytose et l'érythrocytose sont bien une conséquence de l'emphysème, il pourrait être envisagé de générer des souris KO pour TSAP6 uniquement dans les poumons et de voir si elles développent des anomalies sanguines. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'une recombinase CRE inductible par un promoteur régulé par un facteur de transcription spécifique des poumons.

Afin d'approfondir la fonction de TSAP6 dans la voie P53, nous prévoyons d'induire P53 dans ces souris TSAP6 et de voir quelle fonction de P53 est altérée par le manque de TSAP6.

Discussion

Discussion

Dans le monde 6 millions de personnes sont décédées d'un cancer en l'an 2000. En France, les cancers représentent la première cause de mortalité chez les hommes et la deuxième chez les femmes après les maladies cardiovasculaires. Les études de l'OMS prévoient une augmentation de 50% de l'apparition des cancers d'ici 2020. Le vieillissement de la population, le tabagisme et le manque d'activité physique sont les facteurs avancés pour expliquer ces projections alarmantes.

Les cancers se caractérisent par une intense prolifération de cellules ayant acquis des mutations dans leur patrimoine génétique. Elles sont dérégulées dans leur cycle cellulaire puisqu'elles se multiplient de façon anarchique. Ces cellules présentant des anomalies devraient être éliminées par la voie apoptotique ou stoppées par les gardiens de l'intégrité cellulaire (gènes suppresseurs de tumeur), mais elles portent souvent des mutations inactivant ces voies. Les mutations des gènes pro-apoptotiques ou suppresseurs de tumeur donnent un avantage sélectif aux cellules tumorales.

Le développement d'un cancer a des causes multifactorielles, mais l'événement clé est souvent une mutation affectant la fonction ou la régulation de la protéine P53 (mutée dans plus de 50% des cancers). Au fur et à mesure de la progression de la tumeur, les cellules cancéreuses vont ensuite accumuler d'autres mutations.

Pour cette raison, des études visant à corriger l'activité de P53 dans les tumeurs sont menées dans l'espoir de déboucher sur une thérapie anticancéreuse. Certains travaux sont focalisés sur la protéine P53 elle-même, alors que d'autres équipes, dont la notre, travaillent plutôt en aval, cherchant des cibles thérapeutiques parmi les effecteurs de P53.

Notre approche consiste également à identifier des protéines impliquées dans la réversion tumorale, phénomène par lequel des cellules cancéreuses perdent certaines de leurs caractéristiques tumorales. Notre équipe a d'abord mis au point une technique permettant de sélectionner ces cellules révertantes à partir de la population cancéreuse et d'en dériver des lignées cellulaires révertantes. Elle a ensuite entrepris l'étude de l'expression différentielle des ARNm entre les lignées parentales tumorales et les lignées révertantes qui en dérivent.

Parmi les gènes que notre groupe a trouvé comme étant régulés par P53 et différentiellement exprimés lors de la réversion tumorale, nous avons choisit de travailler sur *siah-1* et *tsap6*.

Ces deux gènes sont activés transcriptionnellement par P53 et sont surexprimés dans les cellules révertantes par rapport aux cellules parentales. Ce sont ce que nous appelons des TSAP : *Tumor Suppressor Activated Pathway*.

Bien qu'il soit communément admis que Siah-1 fait partie des effecteurs de P53, certaines expériences sur des souris KO semblaient montrer le contraire.

Lors de notre étude, nous avons pu mettre en évidence la présence et la fonctionnalité d'un élément de réponse à P53 dans le promoteur du gène murin *siah-1b*. La protéine P53 est capable de se lier spécifiquement à cette séquence et ainsi de réguler positivement la transcription du gène en aval.

Nous apportons ainsi la preuve que Siah-1b est un effecteur direct de P53.

Notre découverte de la fonctionnalité de la séquence trouvée dans le promoteur de *siah-1b* comme élément de réponse à P53 élargit la gamme des séquences connues pour être régulées transcriptionnellement par P53. En effet, le site de liaison que nous avons identifié ne correspond pas au consensus décrit pour la liaison de P53 à l'ADN. Ce consensus est formé de deux motifs séparés de 0 à 13 pb. Or dans le site que nous avons identifié, les séquences correspond parfaitement au consensus, mais l'espace entre les deux motifs est de 33 pb, une structure prédite pour ne pas permettre la liaison de P53. Pourtant nous avons pu prouver son activité.

L'intégration de ces nouvelles données dans les logiciels d'analyse devrait permettre de trouver de nouvelles cibles potentielles de P53 qui avaient auparavant été écartées.

Notre hypothèse est que P53 induit une contrainte sur la région de 33 pb (soit 3 tours d'hélice) séparant les deux motifs de liaison entraînant. Ce repliement induirait le rapprochement de ces 2 motifs de façon à permettre la liaison de P53.

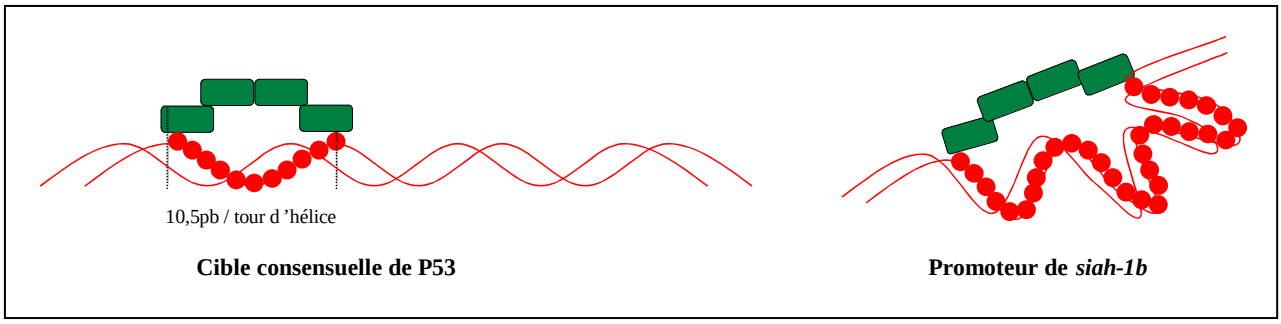


***Figure 38 : Hypothèse d'un repliement de l'ADN pour la liaison de P53 au promoteur de* siah-1b**

De façon à valider cette hypothèse, il est envisageable d'effectuer des délétions entre les 2 motifs de l'élément de réponse à P53 du promoteur de *siah-1b* (pour atteindre 13pb par exemple) et détermoner s'il conserve sa fonctionnalité. On pourrait également remplacer un site consensus (par exemple celui du promoteur de *tsap6*) par le site de *siah-1b* et ainsi voir si cette structure particulière du site de liaison modifie la régulation du gène en aval.

Il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure la structure de l'élément de réponse (0, 13, ou 33pb entre les motifs) module la réponse à P53. Il a été décrit que suivant le type d'activation qu'elle subit, P53 présente des modifications post-traductionnelles différentes qui lui permettent d'activer des gènes différents. On peut supposer que, suivant son état de phosphorylation ou d'acétylation, P53 pourrait se lier aux sites consensuels et/ou aux sites du type de celui du promoteur de *siah-1b*. Des expériences de mutagénèse de P53 pourraient permettre de répondre à cette question.

L'étude de la seconde protéine régulée par P53 et dont l'expression est augmentée dans les cellules révertantes, TSAP6, nous a permis de caractériser son expression et sa fonction chez la souris. Nous avons montré qu'elle présente une distribution tissulaire restreinte à des structures particulières, sans que nous ayons pu corréler cette localisation à une zone fonctionnelle particulière commune à tous les tissus. Au niveau intracellulaire, la protéine est associée à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique. On peut également la détecter par microscopie à la surface de vésicules cytoplasmiques dont nous n'avons pas encore identifié la nature.

Nous avons aussi montré que TSAP6 est N-glycosylée *in vivo* et que sa demi-vie est courte. En outre, elle semble s'oligomériser suite à l'incubation des cellules avec de l'hémine. Ceci n'a, pour l'instant, été corrélé à aucune modification fonctionnelle de TSAP6.

Nous avons obtenu des souris portant une mutation ponctuelle dans le gène *tsap6* et présentant une microcytose, une érythrocytose et de l'emphysème pulmonaire. L'étude des causes de l'apparition de ces phénotypes nous apparaissait comme un bon moyen pour comprendre la fonction de TSAP6.

Nous avons donc entrepris de caractériser les changements histologiques, intracellulaires et moléculaires consécutifs à cette mutation.

Pour l'instant, cette analyse ne nous a pas permis d'apporter de conclusion sur la cause de l'apparition de ces phénotypes, ni sur la fonction de TSAP6. Pourtant plusieurs résultats nous ouvrent des pistes de recherche.

Nous avons montré que la microcytose touche non seulement les érythrocytes, mais également leurs précurseurs (réticulocytes), ce qui indique que la différentiation de la lignée rouge pourrait être affectée. De plus, nos résultats préliminaires montrent que l'expression de TSAP6 pourrait être modifiée dans les poumons des souris mutantes.

TCTP est une protéine anti-apoptotique surexprimée dans les poumons des patients emphysémateux et dont la sécrétion est augmentée par une surexpression de TSAP6. Les premières analyses que nous avons réalisées montrent que TCTP pourrait être plus activement sécrétée par certains types de cellules mutantes. Si ce phénomène était confirmé au niveau des cellules pulmonaires, il pourrait éventuellement expliquer l'emphysème par une induction de l'apoptose au niveau des parois alvéolaires et donc leur destruction dans les souris mutantes.

Nous avons également émis l'hypothèse que les phénotypes apparaissant dans les cellules sanguines soient des conséquences de l'emphysème. Mais, comme l'hématocrite reste normal dans les souris mutantes, cette hypothèse est peu probable.

Toutefois, les phénotypes sanguins et pulmonaires pourraient s'expliquer par des mécanismes communs, puisque TSAP6 pourrait avoir un lien avec des protéines qui, comme elle, sont influencées par l'hémine, et qui ont été impliquées à la fois dans l'érythropoïèse et l'emphysème (NfE2, NrF2, AKR1B3).

Outre un outil intéressant pour évaluer la fonction de TSAP6, ces souris mutantes peuvent se révéler être un bon modèle murin pour des études thérapeutiques portant sur l'emphysème. Il n'existe en effet aujourd'hui aucun traitement efficace contre cette maladie.

Or, le nombre de fumeurs dans le monde étant toujours en augmentation, de plus en plus de personnes seront atteints par cette maladie. Selon l'OMS, le tabagisme, en entraînant l'apparition de plusieurs types de cancers et de maladies cardio-vasculaires, a tué quelque 100 millions de personnes au 20e siècle.

Les études que nous avons réalisées sur la régulation et la fonction des protéines Siah et TSAP6 vont être complétées par l'étude de souris KO pour ces deux protéines. Nous avons généré les constructions génomiques nécessaires à leur élaboration. Si les souris KO pour *siah-1b* sont encore en cours de conception, nous savons déjà que les souris KO pour *tsap6* sont viables.

L'étude des phénotypes engendrés par la délétion de chacun de ces gènes nous permettra d'appréhender leur rôle physiologique.

L'utilisation sur ces souris KO de différents agents de stress induisant P53 nous permettra de déterminer quelles voies de signalisation induites par P53 sont médiées respectivement par Siah-1b et TSAP6.

Puisque l'expression de ces deux protéines est régulée positivement par P53 et qu'elles sont surexprimées dans les cellules révertantes, il sera important d'observer si, comme pour les souris KO *p53*, elles sont plus sujettes à l'apparition de tumeurs.

Ces projets s'intègrent clairement dans la stratégie de caractérisation de cibles potentielles pour la thérapie anticancéreuse.

On sait que de nombreux gènes impliqués dans les cancers sont importants pour le développement embryonnaire. Ce qui est, comme nous l'avons présenté ici, le cas de *siah-1b*. L'étude de la fonction et de la régulation de l'expression de Siah-1b apparaît donc comme un élément intéressant pour la compréhension des mécanismes d'apparition des cancers et donc pour savoir comment les traiter efficacement.

TSAP6 semble jouer un rôle important au niveau pulmonaire et, dans l'hypothèse où son extinction dans les souris entraînerait l'apparition de cancer du poumon, les souris KO *tsap6* représenteraient un modèle animal intéressant pour l'étude de ce cancer.

Notre laboratoire a déjà montré l'importance d'une autre protéine, TCTP, dans le mécanisme de réversion tumorale. La baisse de son expression par stratégie antisens réduit la tumorigénicité des cellules injectées aux souris. Nous avons identifié des molécules qui à la fois diminuent son expression protéique, sont cytotoxiques pour les cellules transformées, et retardent l'apparition des tumeurs dans les souris.

La mise au point de molécules permettant de moduler l'expression ou la fonction des protéines Siah et TSAP6 pourrait de même permettre de faire régresser certaines tumeurs.

Bibliographie

Bibliographie

Abbott, C. and Chambers D. (1994). "Analysis of CAG trinucleotide repeats from mouse cDNA sequences." Ann Hum Genet **58 (Pt 2)**: 87-94.

Adams, M. D., Dubnick M., et al. (1992). "Sequence identification of 2,375 human brain genes." Nature **355**(6361): 632-4.

Adams, M. D., Kerlavage A. R., et al. (1995). "Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence." Nature **377**(6547 Suppl): 3-174.

Aerbajinai, W., Giattina M., et al. (2003). "The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation." Blood **102**(2): 712-7.

Afshar, K., Barton N. R., et al. (1995). "DNA binding and meiotic chromosomal localization of the Drosophila nod kinesin-like protein." Cell **81**(1): 129-38.

Afshar, K., Scholey J., et al. (1995). "Identification of the chromosome localization domain of the Drosophila nod kinesin-like protein." J Cell Biol **131**(4): 833-43.

Alarcon-Vargas, D. and Ronai Z. (2002). "p53-Mdm2--the affair that never ends." Carcinogenesis **23**(4): 541-7.

Alizadeh, A. A., Eisen M. B., et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." Nature **403**(6769): 503-11.

Almog, N. and Rotter V. (1997). "Involvement of p53 in cell differentiation and development." Biochim Biophys Acta **1333**(1): F1-27.

Amson, R. B., Nemani M., et al. (1996). "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3953-7.

Amzallag, N., Passer B. J., et al. (2004). "TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway." J Biol Chem **279**(44): 46104-12.

Antonio, C., Ferby I., et al. (2000). "Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate." Cell **102**(4): 425-35.

Armstrong, J. F., Kaufman M. H., et al. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." Curr Biol **5**(8): 931-6.

Arrigo, A. P., Tanaka K., et al. (1988). "Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome)." Nature **331**(6152): 192-4.

Ashcroft, M., Taya Y., et al. (2000). "Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53." Mol Cell Biol **20**(9): 3224-33.

Baker, S. J., Markowitz S., et al. (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." Science **249**(4971): 912-5.

Banfi, S., Borsani G., et al. (1996). "Identification and mapping of human cDNAs homologous to Drosophila mutant genes through EST database searching." Nat Genet **13**(2): 167-74.

Baptiste, N., Friedlander P., et al. (2002). "The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells." Oncogene **21**(1): 9-21.

Barak, Y., Juven T., et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." Embo J **12**(2): 461-8.

Bargonetti, J., Friedman P. N., et al. (1991). "Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication." Cell **65**(6): 1083-91.

Bayle, J. H., Elenbaas B., et al. (1995). "The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5729-33.

Bennett, M., Macdonald K., et al. (1998). "Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis." Science **282**(5387): 290-3.

Berruti, G. and Martegani E. (2005). "The deubiquitinating enzyme mUBPy interacts with the sperm-specific molecular chaperone MSJ-1: the relation with the proteasome, acrosome, and centrosome in mouse male germ cells." Biol Reprod **72**(1): 14-21.

Bissonnette, N., Wasylyk B., et al. (1997). "The apoptotic and transcriptional transactivation activities of p53 can be dissociated." Biochem Cell Biol **75**(4): 351-8.
Bissonnette, N. and Hunting D. J. (1998). "p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage." Oncogene **16**(26): 3461-9.
Boehm, J., He Y., et al. (2001). "Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH." Embo J **20**(15): 4153-62.
Bogdan, S., Senkel S., et al. (2001). "Misexpression of Xsiah-2 induces a small eye phenotype in Xenopus." Mech Dev **103**(1-2): 61-9.
Boldrick, J. C., Alizadeh A. A., et al. (2002). "Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 972-7.
Bonniaud, P., Kolb M., et al. (2004). "Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis." J Immunol **173**(3): 2099-108.
Borden, K. L. and Freemont P. S. (1996). "The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family." Curr Opin Struct Biol **6**(3): 395-401.
Borden, K. L. (1998). "RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains." Biochem Cell Biol **76**(2-3): 351-8.
Bouffard, P., Barbar E., et al. (2000). "Interaction cloning and characterization of RoBPI, a novel protein binding to human Ro ribonucleoproteins." Rna **6**(1): 66-78.
Boutten, A., Bonay M., et al. (2004). "Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema." Thorax **59**(10): 850-4.
Boveri, T. (1914). "Zur Frage der entstehung Maligner Tumoren."
Brown, V. M., Ossadtchi A., et al. (2002). "Multiplex three-dimensional brain gene expression mapping in a mouse model of Parkinson's disease." Genome Res **12**(6): 868-84.
Brugiere, N., Rothstein S. J., et al. (2000). "Molecular mechanisms of self-recognition in Brassica self-incompatibility." Trends Plant Sci **5**(10): 432-8.
Brusselle, G. G., Bracke K. R., et al. (2005). "Murine models of COPD." Pulm Pharmacol Ther.
Bruzzoni-Giovanelli, H., Faille A., et al. (1999). "SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process." Oncogene **18**(50): 7101-9.
Bunz, F., Dutriaux A., et al. (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-501.
Bunz, F., Hwang P. M., et al. (1999). "Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents." J Clin Invest **104**(3): 263-9.
Caelles, C., Helmberg A., et al. (1994). "p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes." Nature **370**(6486): 220-3.
Canman, C. E., Gilmer T. M., et al. (1995). "Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis." Genes Dev **9**(5): 600-11.
Cardoso, W. V., Sekhon H. S., et al. (1993). "Collagen and elastin in human pulmonary emphysema." Am Rev Respir Dis **147**(4): 975-81.
Carthew, R. W. and Rubin G. M. (1990). "seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye." Cell **63**(3): 561-77.
Castillo-Davis, C. I., Kondrashov F. A., et al. (2004). "The functional genomic distribution of protein divergence in two animal phyla: coevolution, genomic conflict, and constraint." Genome Res **14**(5): 802-11.
Chaisson, M. L., Branstetter D. G., et al. (2004). "Osteoclast differentiation is impaired in the absence of inhibitor of kappa B kinase alpha." J Biol Chem **279**(52): 54841-8.
Chambaut-Guerin, A. M. and Pairault J. (2005). "Tumour necrosis factor alpha-induced adipose-related protein (TIARP): co-localization with caveolin-1." Biol Cell **97**(5): 339-47.
Chamberlain, D. A. and Millard F. J. (1963). "The Treatment of Plycythaemia a/Chamberlain Da, Millard Fj: The Treatment of Polycythaemia Secondary to Hypoxic Lung Disease by Continuous Oxygen Administration." Q J Med **32**: 341-50.
Chan, S. S., Zheng H., et al. (1996). "UNC-40, a C. elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues." Cell **87**(2): 187-95.

Chang, B. D., Swift M. E., et al. (2002). "Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 389-94.
Chen, J., Wu X., et al. (1996). "mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein." Mol Cell Biol **16**(5): 2445-52.
Cheng, J., Yee J. K., et al. (1992). "Suppression of acute lymphoblastic leukemia by the human wild-type p53 gene." Cancer Res **52**(1): 222-6.
Christophorou, M. A., Martin-Zanca D., et al. (2005). "Temporal dissection of p53 function in vitro and in vivo." Nat Genet.
Chuikov, S., Kurash J. K., et al. (2004). "Regulation of p53 activity through lysine methylation." Nature **432**(7015): 353-60.
Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life." Embo J **17**(24): 7151-60.
Ciechanover, A. and Schwartz A. L. (1998). "The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2727-30.
Conaway, R. C., Brower C. S., et al. (2002). "Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation." Science **296**(5571): 1254-8.
Cooper, H. M. (2002). "Axon guidance receptors direct growth cone pathfinding: rivalry at the leading edge." Int J Dev Biol **46**(4): 621-31.
Coulouarn, C., Derambure C., et al. (2005). "Global gene repression in hepatocellular carcinoma and fetal liver, and suppression of dudulin-2 mRNA as a possible marker for the cirrhosis-to-tumor transition." J Hepatol **42**(6): 860-9.
Cournand, A. (1950). "Some aspects of the pulmonary circulation in normal man and in chronic cardiopulmonary diseases." Circulation **2**(5): 641-57.
Crawford, L. V., Pim D. C., et al. (1981). "Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 41-5.
Crawford, L. V., Pim D. C., et al. (1982). "Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer." Int J Cancer **30**(4): 403-8.
Cui, Y., Brugiere N., et al. (1999). "Structural and transcriptional comparative analysis of the S locus regions in two self-incompatible Brassica napus lines." Plant Cell **11**(11): 2217-31.
Cui, Y., Bi Y. M., et al. (2000). "The S locus glycoprotein and the S receptor kinase are sufficient for self-pollen rejection in Brassica." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3713-7.
D'Armiento, J., Dalal S. S., et al. (1992). "Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema." Cell **71**(6): 955-61.
Dahm-Daphi, J., Hubbe P., et al. (2005). "Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53." Oncogene **24**(10): 1663-72.
Davies, G. C., Ettenberg S. A., et al. (2004). "Cbl-b interacts with ubiquitinated proteins; differential functions of the UBA domains of c-Cbl and Cbl-b." Oncogene **23**(42): 7104-15.
de Souza-Pinto, N. C., Harris C. C., et al. (2004). "p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria." Oncogene **23**(39): 6559-68.
de Stanchina, E., McCurrach M. E., et al. (1998). "E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor." Genes Dev **12**(15): 2434-42.
Degtyareva, N., Subramanian D., et al. (2001). "Analysis of the binding of p53 to DNAs containing mismatched and bulged bases." J Biol Chem **276**(12): 8778-84.
DeLeo, A. B., Jay G., et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2420-4.
Della, N. G., Senior P. V., et al. (1993). "Isolation and characterisation of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina)." Development **117**(4): 1333-43.
Della, N. G., Bowtell D. D., et al. (1995). "Expression of Siah-2, a vertebrate homologue of Drosophila sina, in germ cells of the mouse ovary and testis." Cell Tissue Res **279**(2): 411-9.

DeMeo, D. L. and Silverman E. K. (2004). "Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk." Thorax **59**(3): 259-64.
Deng, Y. and Wu X. (2000). "Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12050-5.
Desagher, S., Severac D., et al. (2005). "Genes regulated in neurons undergoing transcription-dependent apoptosis belong to signaling pathways rather than the apoptotic machinery." J Biol Chem **280**(7): 5693-702.
Dickins, R. A., Frew I. J., et al. (2002). "The ubiquitin ligase component Siah1a is required for completion of meiosis I in male mice." Mol Cell Biol **22**(7): 2294-303.
Diller, L., Kassel J., et al. (1990). "p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas." Mol Cell Biol **10**(11): 5772-81.
Ding, H. F. and Fisher D. E. (2001). "p53, caspase 8, and regulation of apoptosis after ionizing radiation." J Pediatr Hematol Oncol **23**(3): 185-8.
Dippold, W. G., Jay G., et al. (1981). "p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(3): 1695-9.
Donehower, L. A., Harvey M., et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." Nature **356**(6366): 215-21.
Duda, D. G., Sunamura M., et al. (2002). "Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumour angiogenesis." Br J Cancer **86**(3): 490-6.
Dupont, J., Khan J., et al. (2001). "Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis." Endocrinology **142**(11): 4969-75.
el-Deiry, W. S., Kern S. E., et al. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." Nat Genet **1**(1): 45-9.
el-Deiry, W. S., Tokino T., et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.
el-Deiry, W. S., Harper J. W., et al. (1994). "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis." Cancer Res **54**(5): 1169-74.
Eliyahu, D., Raz A., et al. (1984). "Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells." Nature **312**(5995): 646-9.
Eliyahu, D., Michalovitz D., et al. (1989). "Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8763-7.
Ernst, T., Hergenhahn M., et al. (2002). "Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue." Am J Pathol **160**(6): 2169-80.
Fanelli, M., Fantozzi A., et al. (2004). "The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome." J Biol Chem **279**(7): 5374-9.
Fang, L., Li G., et al. (2001). "p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling cascades." Embo J **20**(8): 1931-9.
Fantappie, M. R., Osman A., et al. (2003). "Cloning of Schistosoma mansoni Seven in Absentia (SmSINA)(+) homologue cDNA, a gene involved in ubiquitination of SmRXR1 and SmRXR2." Mol Biochem Parasitol **131**(1): 45-54.
Farmer, G., Bargonetti J., et al. (1992). "Wild-type p53 activates transcription in vitro." Nature **358**(6381): 83-6.
Fasshauer, M., Klein J., et al. (2003). "GH is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose related protein in 3T3-L1 adipocytes." J Endocrinol **178**(3): 523-31.
Fasshauer, M., Kralisch S., et al. (2004). "Interleukin-6 is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose-related protein in 3T3-L1 adipocytes." FEBS Lett **560**(1-3): 153-7.

Favre, C. J., Mancuso M., et al. (2003). "Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(5): H1917-38.
Fazeli, A., Dickinson S. L., et al. (1997). "Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene." Nature **386**(6627): 796-804.
Feng, L., Lin T., et al. (2005). "Functional Analysis of the Roles of Posttranslational Modifications at the p53 C Terminus in Regulating p53 Stability and Activity." Mol Cell Biol **25**(13): 5389-95.
Ferbeyre, G., de Stanchina E., et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." Genes Dev **14**(16): 2015-27.
Fields, S. and Jang S. K. (1990). "Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein." Science **249**(4972): 1046-9.
Finlay, C. A., Hinds P. W., et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." Cell **57**(7): 1083-93.
Flores, E. R., Tsai K. Y., et al. (2002). "p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage." Nature **416**(6880): 560-4.
Foronjy, R. and D'Armiento J. (2001). "The role of collagenase in emphysema." Respir Res **2**(6): 348-52.
Frasor, J., Stossi F., et al. (2004). "Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells." Cancer Res **64**(4): 1522-33.
Freedman, B. J. and Penington D. G. (1963). "Erythrocytosis in Emphysema." Br J Haematol **20**: 425-30.
Frew, I. J., Dickins R. A., et al. (2002). "Normal p53 function in primary cells deficient for Siah genes." Mol Cell Biol **22**(23): 8155-64.
Frew, I. J., Hammond V. E., et al. (2003). "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." Mol Cell Biol **23**(24): 9150-61.
Frew, I. J., Sims N. A., et al. (2004). "Osteopenia in Siah1a mutant mice." J Biol Chem **279**(28): 29583-8.
Friedman, P. N., Chen X., et al. (1993). "The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3319-23.
Fu, L., Minden M. D., et al. (1996). "Translational regulation of human p53 gene expression." Embo J **15**(16): 4392-401.
Gannon, J. V. and Lane D. P. (1991). "Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport." Nature **349**(6312): 802-6.
Gehring, U. (2004). "Biological activities of HAP46/BAG-1. The HAP46/BAG-1 protein: regulator of HSP70 chaperones, DNA-binding protein and stimulator of transcription." EMBO Rep **5**(2): 148-53.
Germani, A., Romero F., et al. (1999). "hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways." Mol Cell Biol **19**(5): 3798-807.
Germani, A., Bruzzoni-Giovanelli H., et al. (2000). "SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis." Oncogene **19**(52): 5997-6006.
Germani, A., Prabel A., et al. (2003). "SIAH-1 interacts with CtIP and promotes its degradation by the proteasome pathway." Oncogene **22**(55): 8845-51.
Ghosh, A., Stewart D., et al. (2004). "Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing." Mol Cell Biol **24**(18): 7987-97.
Ginsberg, D., Oren M., et al. (1990). "Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene." Oncogene **5**(9): 1285-90.
Ginsberg, D., Mechta F., et al. (1991). "Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 9979-83.
Goldammer, T., Kata S. R., et al. (2002). "A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2106-11.
Gorospe, M., Cirielli C., et al. (1997). "p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells." Oncogene **14**(8): 929-35.

Green, M. C. and Sidman R. L. (1962). "Tottering--a neuromusclar mutation in the mouse. And its linkage with oligosyndacylism." J Hered **53**: 233-7.
Gu, W. and Roeder R. G. (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." Cell **90**(4): 595-606.
Habelhah, H., Frew I. J., et al. (2002). "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." Embo J **21**(21): 5756-65.
Habelhah, H., Laine A., et al. (2004). "Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah." J Biol Chem **279**(51): 53782-8.
Hackett, N. R., Heguy A., et al. (2003). "Variability of antioxidant-related gene expression in the airway epithelium of cigarette smokers." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(3 Pt 1): 331-43.
Hainaut, P., Hall A., et al. (1994). "Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding." Oncogene **9**(1): 299-303.
Haldar, S., Negrini M., et al. (1994). "Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells." Cancer Res **54**(8): 2095-7.
Hara, M. R., Agrawal N., et al. (2005). "S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding." Nat Cell Biol.
Harlow, E., Pim D. C., et al. (1981). "Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells." J Virol **37**(2): 564-73.
Harper, J. W., Adami G. R., et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-16.
Harris, H., Miller O. J., et al. (1969). "Suppression of malignancy by cell fusion." Nature **223**(204): 363-8.
Haupt, Y., Rowan S., et al. (1995). "Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53." Genes Dev **9**(17): 2170-83.
Haupt, Y., Maya R., et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-9.
Hautamaki, R. D., Kobayashi D. K., et al. (1997). "Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice." Science **277**(5334): 2002-4.
Heard, E. and Avner P. (2000). "Trans-Siberian X press report. International Symposium on X Chromosome Inactivation in Mammals, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia, 6-12 September, 1999." Trends Genet **16**(2): 64-5.
Herbert, V., Gottlieb C., et al. (1964). "Polycythaemia and Iron Deficiency in Pulmonary "Emphysema"." Lancet **13**: 1018.
Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." Trends Cell Biol **9**(3): 107-12.
Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 195-201.
Hoffmann, R., Seidl T., et al. (2002). "Changes in gene expression profiles in developing B cells of murine bone marrow." Genome Res **12**(1): 98-111.
Hoh, J., Jin S., et al. (2002). "The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8467-72.
Hohfeld, J., Cyr D. M., et al. (2001). "From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation." EMBO Rep **2**(10): 885-90.
Holloway, A. J., Della N. G., et al. (1997). "Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia." Genomics **41**(2): 160-8.
Holz, O., Zuhlke I., et al. (2004). "Lung fibroblasts from patients with emphysema show a reduced proliferation rate in culture." Eur Respir J **24**(4): 575-9.
House, C. M., Frew I. J., et al. (2003). "A binding motif for Siah ubiquitin ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3101-6.
Hrabe de Angelis, M. H., Flaswinkel H., et al. (2000). "Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis." Nat Genet **25**(4): 444-7.
Hu, G., Chung Y. L., et al. (1997). "Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene." Genomics **46**(1): 103-11.
Hu, G., Zhang S., et al. (1997). "Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway." Genes Dev **11**(20): 2701-14.

Hu, G. and Fearon E. R. (1999). "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." Mol Cell Biol **19**(1): 724-32.
Hubert, R. S., Vivanco I., et al. (1999). "STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14523-8.
Hupp, T. R., Meek D. W., et al. (1992). "Regulation of the specific DNA binding function of p53." Cell **71**(5): 875-86.
Hupp, T. R. and Lane D. P. (1994). "Allosteric activation of latent p53 tetramers." Curr Biol **4**(10): 865-75.
Hupp, T. R. and Lane D. P. (1995). "Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner." J Biol Chem **270**(30): 18165-74.
Hupp, T. R. (1999). "Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways." Cell Mol Life Sci **55**(1): 88-95.
Hyslop, L. A., Nixon V. L., et al. (2004). "Ca(2+)-promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest." Dev Biol **269**(1): 206-19.
Imbriano, C., Gurtner A., et al. (2005). "Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters." Mol Cell Biol **25**(9): 3737-51.
Ishikawa, K., Nash S. R., et al. (1999). "Competitive interaction of seven in absentia homolog-1A and Ca2+/calmodulin with the cytoplasmic tail of group 1 metabotropic glutamate receptors." Genes Cells **4**(7): 381-90.
Itahana, K., Dimri G., et al. (2001). "Regulation of cellular senescence by p53." Eur J Biochem **268**(10): 2784-91.
Iwai, A., Marusawa H., et al. (2004). "Siah-1L, a novel transcript variant belonging to the human Siah family of proteins, regulates beta-catenin activity in a p53-dependent manner." Oncogene **23**(45): 7593-600.
Iyer, V. R., Eisen M. B., et al. (1999). "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum." Science **283**(5398): 83-7.
Jack, M. T., Woo R. A., et al. (2002). "Chk2 is dispensable for p53-mediated G1 arrest but is required for a latent p53-mediated apoptotic response." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9825-9.
Jackson, P., Ridgway P., et al. (1994). "Transcriptional regulation of the PCNA promoter by p53." Biochem Biophys Res Commun **203**(1): 133-40.
James, C. D., Carlbom E., et al. (1988). "Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages." Cancer Res **48**(19): 5546-51.
Jayaraman, L. and Prives C. (1999). "Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein." Cell Mol Life Sci **55**(1): 76-87.
Jenkins, J. R., Rudge K., et al. (1984). "Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53." Nature **312**(5995): 651-4.
Jenkins, J. R., Rudge K., et al. (1985). "The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis." Nature **317**(6040): 816-8.
Joensuu, T., Hamalainen R., et al. (2001). "Mutations in a novel gene with transmembrane domains underlie Usher syndrome type 3." Am J Hum Genet **69**(4): 673-84.
Johnsen, S. A., Subramaniam M., et al. (2002). "Modulation of transforming growth factor beta (TGFbeta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGFbeta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue." J Biol Chem **277**(34): 30754-9.
Jones, S. N., Roe A. E., et al. (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." Nature **378**(6553): 206-8.
Jost, C. A., Marin M. C., et al. (1997). "p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis." Nature **389**(6647): 191-4.
Kaghad, M., Bonnet H., et al. (1997). "Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers." Cell **90**(4): 809-19.
Kakiuchi, S., Daigo Y., et al. (2003). "Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice." Mol Cancer Res **1**(7): 485-99.

Kammermeier, P. J. and Ikeda S. R. (2001). "A role for Seven in Absentia Homolog (Siah1a) in metabotropic glutamate receptor signaling." BMC Neurosci **2**(1): 15.
Kannan, K., Amariglio N., et al. (2001). "DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53." Oncogene **20**(18): 2225-34.
Kannan, K., Kaminski N., et al. (2001). "DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1." Oncogene **20**(26): 3449-55.
Kasahara, Y., Tuder R. M., et al. (2000). "Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema." J Clin Invest **106**(11): 1311-9.
Kasahara, Y., Tuder R. M., et al. (2001). "Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema." Am J Respir Crit Care Med **163**(3 Pt 1): 737-44.
Kastan, M. B., Onyekwere O., et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6304-11.
Kastan, M. B., Radin A. I., et al. (1991). "Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells." Cancer Res **51**(16): 4279-86.
Kato, M., Patel M. S., et al. (2002). "Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor." J Cell Biol **157**(2): 303-14.
Kauffmann, R. C., Li S., et al. (1996). "Ras1 signaling and transcriptional competence in the R7 cell of Drosophila." Genes Dev **10**(17): 2167-78.
Keino-Masu, K., Masu M., et al. (1996). "Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor." Cell **87**(2): 175-85.
Kennedy, D., Ramsdale T., et al. (1996). "An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling." Nat Genet **12**(3): 329-31.
Kern, S. E., Kinzler K. W., et al. (1991). "Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein." Science **252**(5013): 1708-11.
Kim, B., Bang S., et al. (2003). "Expression profiling and subtype-specific expression of stomach cancer." Cancer Res **63**(23): 8248-55.
Kim, C. J., Cho Y. G., et al. (2004). "Inactivating mutations of the Siah-1 gene in gastric cancer." Oncogene **23**(53): 8591-6.
Kim, H., Jeong W., et al. (2004). "Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway." J Am Soc Nephrol **15**(8): 2042-9.
Kim, S., Dougherty E. R., et al. (2002). "Strong feature sets from small samples." J Comput Biol **9**(1): 127-46.
Kitayama, H., Sugimoto Y., et al. (1989). "A ras-related gene with transformation suppressor activity." Cell **56**(1): 77-84.
Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." Nat Rev Cancer **1**(2): 157-62.
Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.
Ko, M. S., Kitchen J. R., et al. (2000). "Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development." Development **127**(8): 1737-49.
Kolodziej, P. A., Timpe L. C., et al. (1996). "frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance." Cell **87**(2): 197-204.
Korkmaz, K. S., Elbi C., et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer." J Biol Chem **277**(39): 36689-96.
Kostic, C. and Shaw P. H. (2000). "Isolation and characterization of sixteen novel p53 response genes." Oncogene **19**(35): 3978-87.
Kotkow, K. J. and Orkin S. H. (1995). "Dependence of globin gene expression in mouse erythroleukemia cells on the NF-E2 heterodimer." Mol Cell Biol **15**(8): 4640-7.
Kubbutat, M. H., Jones S. N., et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." Nature **387**(6630): 299-303.
Kumar-Sinha, C., Varambally S., et al. (2002). "Molecular cross-talk between the TRAIL and interferon signaling pathways." J Biol Chem **277**(1): 575-85.

Kwon, Y. T., Kashina A. S., et al. (2002). "An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development." Science **297**(5578): 96-9.
Lagreid, A., Hvidsten T. R., et al. (2003). "Predicting gene ontology biological process from temporal gene expression patterns." Genome Res **13**(5): 965-79.
Laird, P. W., van der Lugt N. M., et al. (1993). "In vivo analysis of Pim-1 deficiency." Nucleic Acids Res **21**(20): 4750-5.
Lambert, P. F., Kashanchi F., et al. (1998). "Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP." J Biol Chem **273**(49): 33048-53.
Lane, D. P. and Crawford L. V. (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-3.
Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.
Lane, D. P. G., J. (1983). Cell. biol. Int. Rep. **7**: 513-514.
Lassus, P., Bertrand C., et al. (1999). "Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant." Oncogene **18**(33): 4699-709.
Laurell, C. E. S. (1963). "The electrophoretic a1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency." Scand J Clin Lab Invest **15**: 132-140.
Lee, C. K., Allison D. B., et al. (2002). "Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14988-93.
Lee, S., Cavallo L., et al. (1997). "Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage." J Biol Chem **272**(11): 7532-9.
Levine, A. J. (1989). "The p53 tumor suppressor gene and gene product." Princess Takamatsu Symp **20**: 221-30.
Li, L., Li J., et al. (2004). "[Clinical significance of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate expressed in prostatic carcinoma]." Zhonghua Nan Ke Xue **10**(5): 351-4.
Li, M., Brooks C. L., et al. (2003). "Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." Science **302**(5652): 1972-5.
Li, S., Li Y., et al. (1997). "Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack." Cell **90**(3): 469-78.
Li, S., Ting N. S., et al. (2000). "Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response." Nature **406**(6792): 210-5.
Li, S., Xu C., et al. (2002). "Phyllopod acts as an adaptor protein to link the sina ubiquitin ligase to the substrate protein tramtrack." Mol Cell Biol **22**(19): 6854-65.
Liani, E., Eyal A., et al. (2004). "Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5500-5.
Liebow, A. A. (1959). "Pulmonary emphysema with special reference to vascular changes." Am Rev Respir Dis **80**(1, Part 2): 67-93.
Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli H., et al. (1998). "p21WAF-1 reorganizes the nucleus in tumor suppression." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1131-5.
Linzer, D. I., Maltzman W., et al. (1979). "The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen." Virology **98**(2): 308-18.
Liu, J., Stevens J., et al. (2001). "Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein." Mol Cell **7**(5): 927-36.
Lohrum, M. and Scheidtmann K. H. (1996). "Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes." Oncogene **13**(12): 2527-39.
Lorick, K. L., Jensen J. P., et al. (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11364-9.
Lu, H. and Levine A. J. (1995). "Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5154-8.
Lu, P. D., Jousse C., et al. (2004). "Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2." Embo J **23**(1): 169-79.
Luders, J., Demand J., et al. (2000). "Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function." J Biol Chem **275**(20): 14817-23.
MacDonald, S. M., Rafnar T., et al. (1995). "Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor." Science **269**(5224): 688-90.

Maeda, A., Yoshida T., et al. (2002). "The characterization of the human Siah-1 promoter(1)." FEBS Lett **512**(1-3): 223-6.
Maekawa, M., Yamamoto T., et al. (2005). "Requirement of the MAP kinase signaling pathways for mouse preimplantation development." Development **132**(8): 1773-83.
Maki, C. G., Huibregtse J. M., et al. (1996). "In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1)." Cancer Res **56**(11): 2649-54.
Malcomson, R. D., Oren M., et al. (1995). "p53-independent death and p53-induced protection against apoptosis in fibroblasts treated with chemotherapeutic drugs." Br J Cancer **72**(4): 952-7.
Maltzman, W. and Czyzyk L. (1984). "UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells." Mol Cell Biol **4**(9): 1689-94.
Mandon-Pepin, B., Oustry-Vaiman A., et al. (2003). "Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary." Biol Reprod **68**(3): 985-95.
Mariette, X., Sibilia J., et al. (2002). "A new defensive mechanism to prevent apoptosis in salivary ductal cells from patients with Sjogren's syndrome: over-expression of p53 and p21." Rheumatology (Oxford) **41**(1): 96-9.
Martinez, J., Georgoff I., et al. (1991). "Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein." Genes Dev **5**(2): 151-9.
Martinez-Climent, J. A., Alizadeh A. A., et al. (2003). "Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations." Blood **101**(8): 3109-17.
Matsuo, K., Satoh S., et al. (2003). "SIAH1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas." Genes Chromosomes Cancer **36**(3): 283-91.
Matsuzawa, S., Takayama S., et al. (1998). "p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1." Embo J **17**(10): 2736-47.
Matsuzawa, S. I. and Reed J. C. (2001). "Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses." Mol Cell **7**(5): 915-26.
McDowell, S. A., Gammon K., et al. (2003). "Inhibition of nitric oxide restores surfactant gene expression following nickel-induced acute lung injury." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(2): 188-98.
McKay, B. C., Becerril C., et al. (2001). "P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts." Oncogene **20**(46): 6805-8.
Medhioub, M., Vaury C., et al. (2000). "Lack of somatic mutation in the coding sequence of SIAH1 in tumors hemizygous for this candidate tumor suppressor gene." Int J Cancer **87**(6): 794-7.
Melchior, F. and Hengst L. (2002). "SUMO-1 and p53." Cell Cycle **1**(4): 245-9.
Meng, R. D., McDonald E. R., 3rd, et al. (2000). "The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis." Mol Ther **1**(2): 130-44.
Mercer, W. E., Shields M. T., et al. (1990). "Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6166-70.
Mercer, W. E., Shields M. T., et al. (1991). "Growth suppression induced by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(5): 1958-62.
Michaeli, D. and Fudenberg H. H. (1974). "Antibodies to collagen in patients with emphysema." Clin Immunol Immunopathol **3**(2): 187-92.
Michalovitz, D., Halevy O., et al. (1990). "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53." Cell **62**(4): 671-80.
Michieli, P., Chedid M., et al. (1994). "Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway." Cancer Res **54**(13): 3391-5.
Miled, C., Pontoglio M., et al. (2005). "A genomic map of p53 binding sites identifies novel p53 targets involved in an apoptotic network." Cancer Res **65**(12): 5096-104.

Milner, J. and Medcalf E. A. (1990). "Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135." J Mol Biol **216**(3): 481-4.
Milner, J. and Medcalf E. A. (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." Cell **65**(5): 765-74.
Minamoto, T., Buschmann T., et al. (2001). "Distinct pattern of p53 phosphorylation in human tumors." Oncogene **20**(26): 3341-7.
Moi, P., Chan K., et al. (1994). "Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9926-30.
Moldes, M., Lasnier F., et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein (TIARP), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor-alpha and adipose conversion." J Biol Chem **276**(36): 33938-46.
Moll, U. M. and Zaika A. (2001). "Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53." FEBS Lett **493**(2-3): 65-9.
Momand, J., Zambetti G. P., et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." Cell **69**(7): 1237-45.
Momand, J., Jung D., et al. (1998). "The MDM2 gene amplification database." Nucleic Acids Res **26**(15): 3453-9.
Mondal, N. and Parvin J. D. (2005). "The Tumor Suppressor Protein p53 Functions Similarly to p63 and p73 in Activating Transcription In Vitro." Cancer Biol Ther **4**(4).
Montes de Oca Luna, R., Wagner D. S., et al. (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53." Nature **378**(6553): 203-6.
Moriyoshi, K., Iijima K., et al. (2004). "Seven in absentia homolog 1A mediates ubiquitination and degradation of group 1 metabotropic glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8614-9.
Mosner, J., Mummenbrauer T., et al. (1995). "Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis." Embo J **14**(18): 4442-9.
Mummenbrauer, T., Janus F., et al. (1996). "p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity." Cell **85**(7): 1089-99.
Muschen, M., Lee S., et al. (2002). "Molecular portraits of B cell lineage commitment." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10014-9.
Myers, M. C., Wang J., et al. (2005). "A new family of small molecules to probe the reactivation of mutant p53." J Am Chem Soc **127**(17): 6152-3.
Nagano, Y., Yamashita H., et al. (2003). "Siah-1 facilitates ubiquitination and degradation of synphilin-1." J Biol Chem **278**(51): 51504-14.
Nakayama, K., Frew I. J., et al. (2004). "Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia." Cell **117**(7): 941-52.
Nakayama, K. and Ronai Z. (2004). "Siah: new players in the cellular response to hypoxia." Cell Cycle **3**(11): 1345-7.
Nambiar, P. R., Giardina C., et al. (2002). "Role of the alternating reading frame (P19)-p53 pathway in an in vivo murine colon tumor model." Cancer Res **62**(13): 3667-74.
Nayak, B. K. and Das B. R. (1997). "Differential binding of nuclear proteins to the TP53 gene promoter in male breast tumour." Eur J Cancer **33**(9): 1484-7.
Neiman, P. E., Ruddell A., et al. (2001). "Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6378-83.
Nemani, M., Linares-Cruz G., et al. (1996). "Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9039-42.
Ney, P. A., Sorrentino B. P., et al. (1990). "Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein." Nucleic Acids Res **18**(20): 6011-7.
Nishinaka, T. and Yabe-Nishimura C. (2005). "Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene." J Pharmacol Sci **97**(1): 43-51.
Noda, M., Selinger Z., et al. (1983). "Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(18): 5602-6.

Noda, M. and Ikawa Y. (1986). "Detection of genes with potential of suppressing transforming activity of the v-Ki-ras oncogene." Princess Takamatsu Symp **17**: 261-7.
Noda, M., Kitayama H., et al. (1989). "Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(1): 162-6.
O'Farrell, T. J., Ghosh P., et al. (2004). "Comparison of the effect of mutant and wild-type p53 on global gene expression." Cancer Res **64**(22): 8199-207.
O'Rourke, R. W., Miller C. W., et al. (1990). "A potential transcriptional activation element in the p53 protein." Oncogene **5**(12): 1829-32.
Oberosler, P., Hloch P., et al. (1993). "p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids." Embo J **12**(6): 2389-96.
Oda, K., Arakawa H., et al. (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." Cell **102**(6): 849-62.
Ohsugi, M., Cras-Meneur C., et al. (2005). "Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion." J Biol Chem **280**(6): 4992-5003.
Okabe, H., Satoh S., et al. (2003). "Involvement of PEG10 in human hepatocellular carcinogenesis through interaction with SIAH1." Cancer Res **63**(12): 3043-8.
Oliver, P. L., Bitoun E., et al. (2004). "Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14901-6.
Olmeda, D., Castel S., et al. (2003). "Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis." Mol Biol Cell **14**(7): 2844-60.
Oren, M., Maltzman W., et al. (1981). "Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells." Mol Cell Biol **1**(2): 101-10.
Oren, M. and Levine A. J. (1983). "Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 56-9.
Oren, M. (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." J Biol Chem **274**(51): 36031-4.
Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." Cell Death Differ **10**(4): 431-42.
Orford, K., Orford C. C., et al. (1999). "Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest." J Cell Biol **146**(4): 855-68.
Ozer, H. L. and Jha K. K. (1977). "Malignancy and transformation: expression in somatic cell hybrids and variants." Adv Cancer Res **25**: 53-93.
Page-McCaw, P. S., Amonlirdviman K., et al. (1999). "PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity." Rna **5**(12): 1548-60.
Palmero, I., Pantoja C., et al. (1998). "p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras." Nature **395**(6698): 125-6.
Parada, L. F., Land H., et al. (1984). "Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation." Nature **312**(5995): 649-51.
Park, T. J., Hamanaka H., et al. (2003). "Inhibition of ubiquitin ligase Siah-1A by disabled-1." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 671-8.
Passer, B. J., Nancy-Portebois V., et al. (2003). "The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2284-9.
Pearson, M., Carbone R., et al. (2000). "PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras." Nature **406**(6792): 207-10.
Peifer, M. and Polakis P. (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science **287**(5458): 1606-9.
Peng, C. F., Wei Y., et al. (2002). "Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation." Physiol Genomics **9**(3): 145-55.
Perou, C. M., Jeffrey S. S., et al. (1999). "Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9212-7.

Peters, L. L., Andrews N. C., et al. (1993). "Mouse microcytic anaemia caused by a defect in the gene encoding the globin enhancer-binding protein NF-E2." Nature **362**(6422): 768-70.
Petrache, I., Natarajan V., et al. (2005). "Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice." Nat Med.
Polakis, P. (2001). "More than one way to skin a catenin." Cell **105**(5): 563-6.
Polekhina, G., House C. M., et al. (2002). "Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling." Nat Struct Biol **9**(1): 68-75.
Pollack, R. E., Green H., et al. (1968). "Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability." Proc Natl Acad Sci U S A **60**(1): 126-33.
Polyak, K., Waldman T., et al. (1996). "Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest." Genes Dev **10**(15): 1945-52.
Porkka, K. P., Helenius M. A., et al. (2002). "Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate." Lab Invest **82**(11): 1573-82.
Porkka, K. P., Nupponen N. N., et al. (2003). "Human pHyde is not a classical tumor suppressor gene in prostate cancer." Int J Cancer **106**(5): 729-35.
Prives, C. and Hall P. A. (1999). "The p53 pathway." J Pathol **187**(1): 112-26.
Prives, C. and Manley J. L. (2001). "Why is p53 acetylated?" Cell **107**(7): 815-8.
Rane, S. G., Dubus P., et al. (1999). "Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia." Nat Genet **22**(1): 44-52.
Rangasamy, T., Cho C. Y., et al. (2004). "Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice." J Clin Invest **114**(9): 1248-59.
Raycroft, L., Wu H. Y., et al. (1990). "Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene." Science **249**(4972): 1049-51.
Regula, K. M. and Kirshenbaum L. A. (2001). "p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription." J Mol Cell Cardiol **33**(8): 1435-45.
Reich, N. C. and Levine A. J. (1984). "Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells." Nature **308**(5955): 199-201.
Reisman, D., Greenberg M., et al. (1988). "Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5146-50.
Reisman, D., Elkind N. B., et al. (1993). "c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif." Cell Growth Differ **4**(2): 57-65.
Relaix, F., Wei X., et al. (2000). "Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2105-10.
Rinaldy, A. R., Menon R. P., et al. (2000). "Role of pHyde novel gene product as an intrinsic factor for apoptotic pathway in prostate cancer." Gan To Kagaku Ryoho **27 Suppl 2**: 215-22.
Ro, H., Kim K. E., et al. (2003). "Expression pattern of Siaz gene during the zebrafish embryonic development." Gene Expr Patterns **3**(4): 483-8.
Ro, H., Jang Y., et al. (2004). "The RING domain of Siaz, the zebrafish homologue of Drosophila seven in absentia, is essential for cellular growth arrest." Mol Cells **17**(1): 160-5.
Ro, H., Won M., et al. (2005). "Sinup, a novel Siaz-interacting nuclear protein, modulates neural plate formation in the zebrafish embryos." Biochem Biophys Res Commun.
Rodeberg, D. A., Nuss R. A., et al. (2005). "Recognition of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-expressing tumor cells by peptide antigen-induced cytotoxic T lymphocytes." Clin Cancer Res **11**(12): 4545-52.
Roh, M. S., Hong S. H., et al. (2004). "Gene expression profiling of breast cancers with emphasis of beta-catenin regulation." J Korean Med Sci **19**(2): 275-82.
Ronen, D., Rotter V., et al. (1991). "Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4128-32.

Roperch, J. P., Lethrone F., et al. (1999). "SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1)." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8070-3.
Ross, D. T., Scherf U., et al. (2000). "Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines." Nat Genet **24**(3): 227-35.
Rotter, V. (1983). "p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(9): 2613-7.
Rotter, V., Abutbul H., et al. (1983). "P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts." Embo J **2**(7): 1041-7.
Rovinski, B. and Benchimol S. (1988). "Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene." Oncogene **2**(5): 445-52.
Sakaguchi, K., Herrera J. E., et al. (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." Genes Dev **12**(18): 2831-41.
Sanchez-Pulido, L., Rojas A. M., et al. (2004). "ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer." BMC Cancer **4**(1): 98.
Sankila, E. M., Pakarinen L., et al. (1995). "Assignment of an Usher syndrome type III (USH3) gene to chromosome 3q." Hum Mol Genet **4**(1): 93-8.
Santhanam, U., Ray A., et al. (1991). "Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7605-9.
Satyamoorthy, K., Chehab N. H., et al. (2000). "Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells." Cell Growth Differ **11**(9): 467-74.
Saurin, A. J., Borden K. L., et al. (1996). "Does this have a familiar RING?" Trends Biochem Sci **21**(6): 208-14.
Schuler, M., Bossy-Wetzel E., et al. (2000). "p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release." J Biol Chem **275**(10): 7337-42.
Segel, N. and Bishop J. M. (1966). "The circulation in patients with chronic bronchitis and emphysema at rest and during exercise, with special reference to the influence of changes in blood viscosity and blood volume on the pulmonary circulation." J Clin Invest **45**(10): 1555-68.
Sen, S., Hoffman G. C., et al. (1972). "Erythrocytosis in spontaneously hypertensive rats." J Clin Invest **51**(3): 710-4.
Sengupta, S., Linke S. P., et al. (2003). "BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination." Embo J **22**(5): 1210-22.
Serafini, T., Colamarino S. A., et al. (1996). "Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system." Cell **87**(6): 1001-14.
Seto, E., Usheva A., et al. (1992). "Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 12028-32.
Shaulsky, G., Ben-Ze'ev A., et al. (1990). "Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells." Oncogene **5**(11): 1707-11.
Shaulsky, G., Goldfinger N., et al. (1991). "Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8982-6.
Shaulsky, G., Goldfinger N., et al. (1991). "Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization." Cell Growth Differ **2**(12): 661-7.
Shaw, P., Freeman J., et al. (1996). "Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus." Oncogene **12**(4): 921-30.
Shieh, S. Y., Ikeda M., et al. (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." Cell **91**(3): 325-34.
Shieh, S. Y., Taya Y., et al. (1999). "DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization." Embo J **18**(7): 1815-23.
Shmueli, A. and Oren M. (2005). "Life, death, and ubiquitin: taming the mule." Cell **121**(7): 963-5.

Shohat, O., Greenberg M., et al. (1987). "Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense." Oncogene **1**(3): 277-83.
Shu, H. B., Takeuchi M., et al. (1996). "The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13973-8.
Spik A, O. S., B∏a˝ewicz J, Kotecki M, Formanowicz P, Jaruzelska J (2003). "Studies of SIAH1, potential mRNA target for NANOS1-PUMILIO2 protein complex in the human germ cells." 39th Meeting of the Polish Biochemical Society Gdañsk 16–20 September 2003.
Spira, A., Beane J., et al. (2004). "Gene expression profiling of human lung tissue from smokers with severe emphysema." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(6): 601-10.
Stanton, J. L. and Green D. P. (2001). "Meta-analysis of gene expression in mouse preimplantation embryo development." Mol Hum Reprod **7**(6): 545-52.
Stanton, J. L. and Green D. P. (2002). "A set of 1542 mouse blastocyst and pre-blastocyst genes with well-matched human homologues." Mol Hum Reprod **8**(2): 149-66.
Stehelin, D., Varmus H. E., et al. (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." Nature **260**(5547): 170-3.
Steiner, M. S., Zhang X., et al. (2000). "Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde." Cancer Res **60**(16): 4419-25.
Steinmeyer, K. and Deppert W. (1988). "DNA binding properties of murine p53." Oncogene **3**(5): 501-7.
Stenger, J. E., Mayr G. A., et al. (1992). "Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers." Mol Carcinog **5**(2): 102-6.
Strausberg, R. L., Feingold E. A., et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16899-903.
Su, A. I., Welsh J. B., et al. (2001). "Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures." Cancer Res **61**(20): 7388-93.
Su, A. I., Cooke M. P., et al. (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4465-70.
Sun, L. and Chen Z. J. (2004). "The novel functions of ubiquitination in signaling." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 119-26.
Susini, L., Passer B. J., et al. (2001). "Siah-1 binds and regulates the function of Numb." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15067-72.
Takahashi, Y., Li L., et al. (2005). "Hyaluronan Fragments Induce Endothelial Cell Differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent Manner." J Biol Chem **280**(25): 24195-204.
Takayama, S., Sato T., et al. (1995). "Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity." Cell **80**(2): 279-84.
Tang, A. H., Neufeld T. P., et al. (1997). "PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism." Cell **90**(3): 459-67.
Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata E., et al. (2000). "p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3." J Biol Chem **275**(20): 15578-85.
Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata E., et al. (2001). "Regulation of c-Myb activity by tumor suppressor p53." Blood Cells Mol Dis **27**(2): 479-82.
Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara Y., et al. (2001). "Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension." Faseb J **15**(2): 427-38.
Tarunina, M. and Jenkins J. R. (1993). "Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription transactivation activity." Oncogene **8**(11): 3165-73.
Telerman, A., Tuynder M., et al. (1993). "A model for tumor suppression using H-1 parvovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8702-6.
Thut, C. J., Chen J. L., et al. (1995). "p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60." Science **267**(5194): 100-4.

Tidd, D. M., Broughton C. M., et al. (2003). "CpG oligodeoxynucleotide 5mer-induced apoptosis in MOLT-4 leukaemia cells does not require caspase 3 or new protein synthesis." Nucleic Acids Res **31**(9): 2297-304.
Tiedt, R., Bartholdy B. A., et al. (2001). "The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1." Embo J **20**(15): 4143-52.
Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama A., et al. (1996). "Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle." Embo J **15**(3): 457-67.
Topol, L., Jiang X., et al. (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol **162**(5): 899-908.
Tsuzuki, S., Towatari M., et al. (2000). "Potentiation of GATA-2 activity through interactions with the promyelocytic leukemia protein (PML) and the t(15;17)-generated PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein." Mol Cell Biol **20**(17): 6276-86.
Tuck, S. P. and Crawford L. (1989). "Characterization of the human p53 gene promoter." Mol Cell Biol **9**(5): 2163-72.
Tuder, R. M., Zhen L., et al. (2003). "Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(1): 88-97.
Tuynder, M., Susini L., et al. (2002). "Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14976-81.
Tuynder, M., Fiucci G., et al. (2004). "Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(43): 15364-9.
Tyner, S. D., Venkatachalam S., et al. (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes." Nature **415**(6867): 45-53.
Unger, T., Juven-Gershon T., et al. (1999). "Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2." Embo J **18**(7): 1805-14.
Vallian, S., Gaken J. A., et al. (1997). "Transcriptional repression by the promyelocytic leukemia protein, PML." Exp Cell Res **237**(2): 371-82.
Vanaja, D. K., Cheville J. C., et al. (2003). "Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression." Cancer Res **63**(14): 3877-82.
Vanier, T., Dulfano J., et al. (1963). "Emphysema, hypoxia and the polycthemic response." N Engl J Med **269**: 169-78.
Varshavsky, A. (1996). "The N-end rule: functions, mysteries, uses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12142-9.
Varshavsky, A. (1997). "The ubiquitin system." Trends Biochem Sci **22**(10): 383-7.
Venables, J. P., Dalgliesh C., et al. (2004). "SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome." Hum Mol Genet **13**(14): 1525-34.
Vidal, M. J. and Stahl P. D. (1993). "The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation." Eur J Cell Biol **60**(2): 261-7.
Vikhanskaya, F., D'Incalci M., et al. (1995). "Decreased cytotoxic effects of doxorubicin in a human ovarian cancer-cell line expressing wild-type p53 and WAF1/CIP1 genes." Int J Cancer **61**(3): 397-401.
Waldman, T., Kinzler K. W., et al. (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res **55**(22): 5187-90.
Wang, C. Y., Mayo M. W., et al. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-3.
Wang, J., Iwasaki H., et al. (2005). "Conditional MLL-CBP targets GMP and models therapy-related myeloproliferative disease." Embo J **24**(2): 368-81.
Wang, L., Wu Q., et al. (2001). "Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches." J Biol Chem **276**(47): 43604-10.
Wang, Y., Blandino G., et al. (1999). "Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin." Oncogene **18**(16): 2643-9.
Wang, Z. G., Ruggero D., et al. (1998). "PML is essential for multiple apoptotic pathways." Nat Genet **20**(3): 266-72.

Wasylyk, C., Salvi R., et al. (1999). "p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53." Oncogene **18**(11): 1921-34.
Watanabe, T., Ichikawa A., et al. (1996). "Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma." Leuk Lymphoma **21**(5-6): 391-7, color plates XVI following 5.
Waterman, M. J., Stavridi E. S., et al. (1998). "ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins." Nat Genet **19**(2): 175-8.
Weaver, V. M., Petersen O. W., et al. (1997). "Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies." J Cell Biol **137**(1): 231-45.
Weissman, B. E., Saxon P. J., et al. (1987). "Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression." Science **236**(4798): 175-80.
Wesierska-Gadek, J., Schmid G., et al. (1996). "ADP-ribosylation of wild-type p53 in vitro: binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification." Biochem Biophys Res Commun **224**(1): 96-102.
Wheeler, T. C., Chin L. S., et al. (2002). "Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia." J Biol Chem **277**(12): 10273-82.
Whitfield, M. L., Sherlock G., et al. (2002). "Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors." Mol Biol Cell **13**(6): 1977-2000.
Willers, H., McCarthy E. E., et al. (2000). "Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control." Oncogene **19**(5): 632-9.
Wolkowicz, R., Peled A., et al. (1995). "Augmented DNA-binding activity of p53 protein encoded by a carboxyl-terminal alternatively spliced mRNA is blocked by p53 protein encoded by the regularly spliced form." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6842-6.
Xia, L., Paik A., et al. (2004). "p53 activation in chronic radiation-treated breast cancer cells: regulation of MDM2/p14ARF." Cancer Res **64**(1): 221-8.
Xie, Q., Guo H. S., et al. (2002). "SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals." Nature **419**(6903): 167-70.
Xie, Y. and Varshavsky A. (1999). "The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain." Embo J **18**(23): 6832-44.
Xu, X. R., Huang J., et al. (2001). "Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15089-94.
Yang, A., Kaghad M., et al. (1998). "p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities." Mol Cell **2**(3): 305-16.
Yang, D., Holt G. E., et al. (2001). "Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice." Cancer Res **61**(15): 5857-60.
Yang, Q., Zhang R., et al. (2002). "The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53." J Biol Chem **277**(35): 31980-7.
Yano, M., Imagawa E., et al. (2005). "[In silico and systematic molecular evolutionary analysis of human SIAH1b inactivation]." Hokkaido Igaku Zasshi **80**(2): 201-9.
Ye, J. and Shi X. (2001). "Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells." Mol Cell Biochem **222**(1-2): 189-97.
Yonish-Rouach, E., Resnitzky D., et al. (1991). "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6." Nature **352**(6333): 345-7.
Yoon, H., Liyanarachchi S., et al. (2002). "Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15632-7.
Yu, J., Zhang L., et al. (1999). "Identification and classification of p53-regulated genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14517-22.

Zalups, R. K. (1993). "The Os/+ mouse: a genetic animal model of reduced renal mass." Am J Physiol **264**(1 Pt 2): F53-60.
Zambetti, G. P., Bargonetti J., et al. (1992). "Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element." Genes Dev **6**(7): 1143-52.
Zauberman, A., Flusberg D., et al. (1995). "A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene." Nucleic Acids Res **23**(14): 2584-92.
Zauberman, A., Lupo A., et al. (1995). "Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites." Oncogene **10**(12): 2361-6.
Zhang, J., Guenther M. G., et al. (1998). "Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression." Genes Dev **12**(12): 1775-80.
Zhang, P. and Hawley R. S. (1990). "The genetic analysis of distributive segregation in Drosophila melanogaster. II. Further genetic analysis of the nod locus." Genetics **125**(1): 115-27.
Zhang, P., Knowles B. A., et al. (1990). "A kinesin-like protein required for distributive chromosome segregation in Drosophila." Cell **62**(6): 1053-62.
Zhang, X., Steiner M. S., et al. (2001). "Apoptosis induction in prostate cancer cells by a novel gene product, pHyde, involves caspase-3." Oncogene **20**(42): 5982-90.
Zhang, Y. and Xiong Y. (2001). "Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF." Cell Growth Differ **12**(4): 175-86.
Zhao, R., Gish K., et al. (2000). "Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays." Genes Dev **14**(8): 981-93.
Zhao, Y., Chaiswing L., et al. (2005). "p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase." Cancer Res **65**(9): 3745-50.
Zheng, S. J., Lamhamedi-Cherradi S. E., et al. (2005). "Tumor Suppressor p53 Inhibits Autoimmune Inflammation and Macrophage Function." Diabetes **54**(5): 1423-8.
Zindy, F., Eischen C. M., et al. (1998). "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." Genes Dev **12**(15): 2424-33.
Zipursky, S. L. and Rubin G. M. (1994). "Determination of neuronal cell fate: lessons from the R7 neuron of Drosophila." Annu Rev Neurosci **17**: 373-97.
Zucchi, I., Mento E., et al. (2004). "Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(52): 18147-52.

Annexes

Annexe 1 : Quelques liens sur P53

http://www-p53.iarc.fr/index.html
http://p53.free.fr/
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Hs&CID=408312
http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/P53ID88.html
http://bioinfo1.weizmann.ac.il/cgi-bin/genecards/carddisp?TP53
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=191170
http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P53_HUMAN
http://www.cancerindex.org/geneweb/TP53.htm
http://www.ibiblio.org/dnam/des_p53.htm
http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120445.html
http://p53.genome.ad.jp/index.html
http://harvester.embl.de/harvester/P046/P04637.htm

Annexe 2: Quelques liens sur Siah

Siah-1b
http://ca.expasy.org/uniprot/Q06985
http://www.ensembl.org/Mus_musculus/geneview?gene=ENSMUSG00000040749
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=6677948&dopt=GenBank&term=siah1a&qty=1
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=31127269
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=40786823
http://www.snps3d.org/modules.php?name=SnpAnalysis&locus_ac=6477
http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult
http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/124606.html?IN=1

Siah-1a
http://ca.expasy.org/uniprot/P61092
http://www.ensembl.org/Mus_musculus/geneview?gene=ENSMUSG00000036840
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=6677946&dopt=GenBank&term=siah1a&qty=1
http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/124605.html?IN=1

Siah-1
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000196470
http://telethon.bio.unipd.it/GETProfiles/Cardiac_Muscle/ESTs/Hs.184081.html
http://www.rzpd.de/cgi-bin/cards/carddisp?SIAH1
http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/fiche.php?symbol=SIAH1
http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult
http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes_gc/GC_SIAH1.html
http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/92157.html?IN=1
http://harvester.embl.de/harvester/Q8IU/Q8IUQ4.htm

Famille Sina
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam03145
http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/getdesc?name=Sina
http://www.ebi.uniprot.org/uniprot-srv/protein/uniProtView.do?proteinAc=P29304&pager.offset=0

Annexe 3 : Quelques liens sur TSAP6

http://harvester.embl.de/harvester/Q4ZG/Q4ZG36.htm
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000115107
http://www.ensembl.org/Mus_musculus/geneview?gene=ENSMUSG00000026389
http://www.ucsf.edu/pgdb/gene/167.html
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=55240
http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?009705
http://ca.expasy.org/uniprot/Q86SF6
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=28372379
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=28372377

Annexe 4 : Lexique

1/2 vie	Définit la durée au bout de laquelle la quantité d'une protéine a diminué de moitié.
Apoptose	Mécanisme par lequel la cellule induit sa propre mort.
Cellule révertante	Cellule, à l'origine tumorale, présentant un phénotype tumoral atténué.
Cellule transformée	Cellule qui se caractérise par une indépendance d'ancrage, une indépendance vis à vis des signaux de prolifération, une capacité proliférative illimitée et un pouvoir invasif. Une cellule transformée devient cancéreuse lorsqu'elle acquiert la potentialité d'induire des tumeurs lors d'injection en souris
Emphysème	Maladie des poumons caractérisée par un élargissement des alvéoles.
Endocytose	Mécanisme par lequel des vésicules s'invaginent à la surface des cellules et sont internalisées
Epissage alternatif	Processus permettant d'exciser les introns d'un ARNm de plusieurs façons
Erythrocyte	Globule rouge chargé de transporter l'oxygène dans le sang.
Erythrocytose	Affection sanguine caractérisée par un nombre anormalement élevé des globules rouges.
Exocytose	Mécanisme par lequel des composés contenus dans des vésicules sont expulsés de la cellule
Exon	Partie de la séquence d'un gène qui est conservée au niveau de l'ARN maturé
Facteur de transcription	Protéine pouvant réguler la transcription de gènes cibles en se liant à leur promoteur.
Gène suppresseur de tumeur	Gène qui est sous-activé lorsqu'il est muté et protége "en temps normal" les cellules de leur transformation cellulaire
Hématocrite	Correspond au pourcentage qu'occupent en volume les érythrocytes par rapport au volume total du sang
Hémoglobine	Complexe (globine-fer-hémine) présent dans les érythrocytes et dont la fonction est de lier l'oxygène.
Hépatocytes	Cellules composant le foie.
Immunofluorescence	Technique d'analyse microscopique de l'expression de protéines marquées par des anticorps fluorescents dans des cellules
Immunohistochimie	Technique d'analyse microscopique de l'expression de protéines marquées par des anticorps dans des tissus
Intron	Partie de la séquence d'un gène qui est excisée lors de la maturation des ARN
Méïose	Phénomène permettant de générer des gamètes à partir de cellules souches
Microcytose	Affection sanguine caractérisée par une petite taille des érythrocytes.
Mitose	Phénomène cellulaire permettant la division d'une cellule en deux cellules filles identiques
Northern blot	Technique permettant d'analyser l'expression des ARN messagers.
Promoteur	Région régulatrice de la transcription d'un gène
Proto-oncogène	Gène qui est sur-activé lorsqu'il est muté et entraîne alors des dérèglements cellulaires pouvant aboutir au développement d'une tumeur.
Pulse chase	Technique permettant de calculer la demi-vie des protéines.
Réticulocytes	Précurseurs des érythrocytes.
Réversion tumorale	Phénomène par lequel une cellule tumorale devient révertante.
Sécrétion	Mécanisme par lequel des molécules sont relarguées de la cellule
Southern blot	Technique permettant de déterminer la taille de fragments d'ADN génomique

Thalassémie	Les thalassémies sont un groupe de maladies congénitales caractérisées par une anomalie de synthèse des chaînes de globines, composantes de l'hémoglobine.
Traduction	Mécanisme permettant de passer de l'ARN à la protéine.
Transactivation	Régulation positive d'un facteur de transcription sur l'expression d'un gène.
Transcription	Mécanisme permettant de passer de l'ADN à l'ARN.
Transformation cellulaire	Mécanisme qui fait passer la cellule d'un état normal à un état transformé.
Translocation	Se dit d'un déplacement d'une protéine d'une structure intracellulaire à une autre.
Ubiquitination	Réaction de liaison d'une Ubiquitine à une protéine.
Ubiquitine	Petite protéine de 8kDa qui peut être attachée aux protéines.
Western blot	Technique permettant d'analyser l'expression des protéines.