

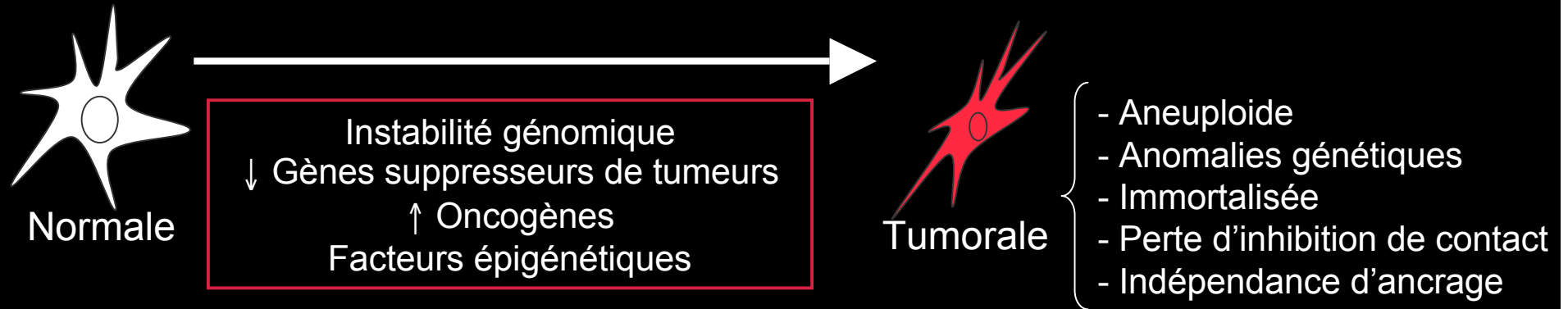
Réversion tumorale

Etude fonctionnelle de TSAP6 et TCTP

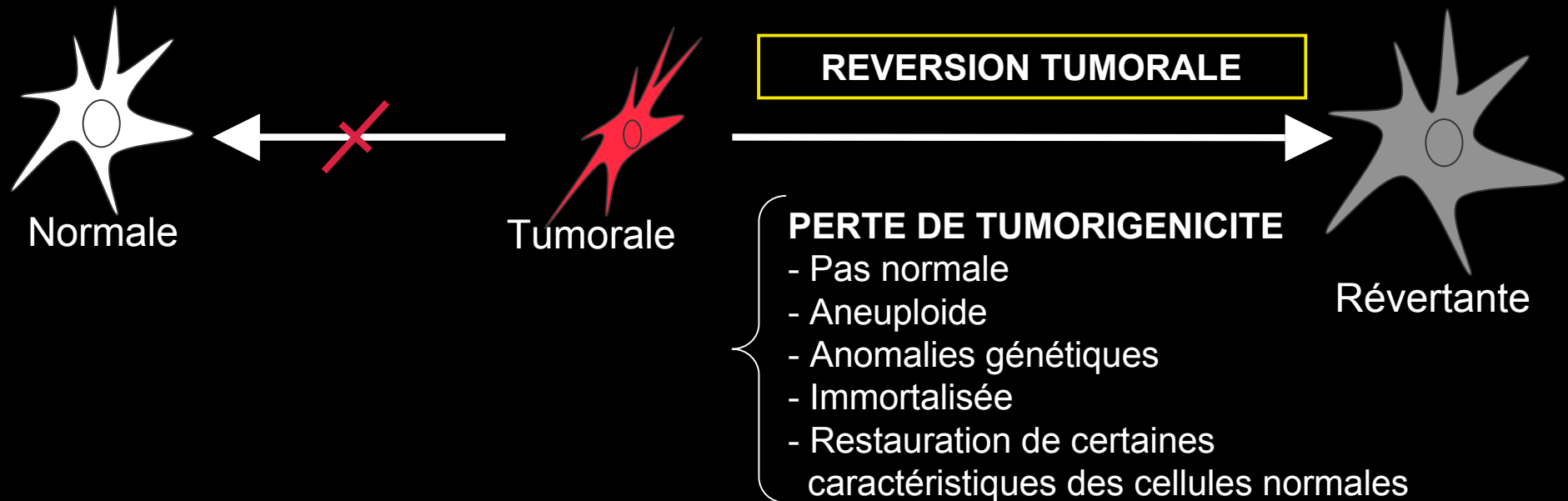
Adam Telerman et Robert Amson

- **La réversion tumorale**
- **Les gènes impliqués dans la réversion tumorale**
 - **TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway)**
 - **TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)**
- **TCTP nouvelle cible: application thérapeutique potentielle**

Comment une cellule devient-elle tumorale?



Comment une cellule réverte t-elle vers un état moins tumoral?

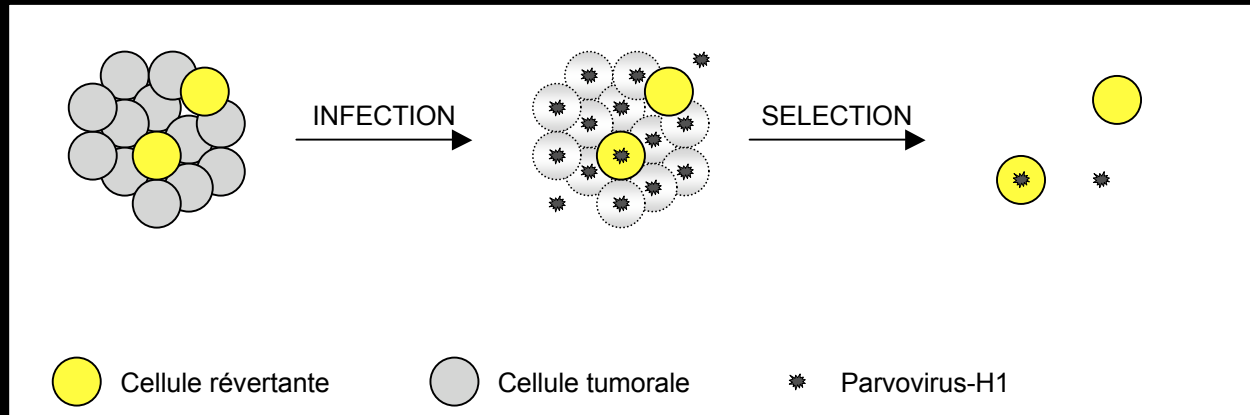


La réversion tumorale

- **Concept introduit par R.E. Pollack en 1968** (*Pollack, Green and Todaro 1968*)
A partir de NIH3T3 transformées par le virus SV40
Isolement des premiers « flats revertants »

- **La stratégie d'Adam Telerman et Robert Amson** (*Telerman et al., 1993*)
 - Cellules cancéreuses humaines
 - Sélection par le Parvovirus-H1

Le parvovirus-H1 est cytotoxique pour les cellules tumorales ou transformées



SELECTION NEGATIVE

Les modèles de révertants

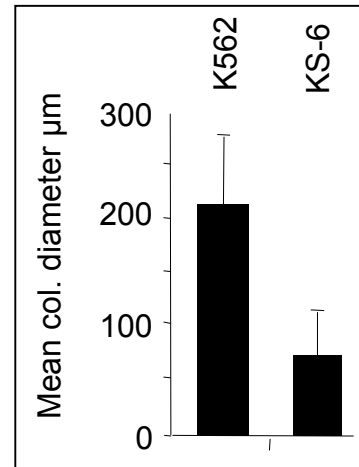
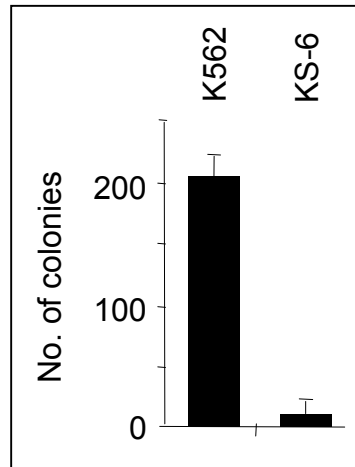
- Différents modèles de révertants

(Nemani et al., PNAS 1996) (Tuynder et al., PNAS 2002) (Tuynder et al., PNAS 2004)

- Lignées de Leucémie: U937, K562
- Lignées de Cancer du sein: MDA-MB231, T47D et BT-20
- Lignées de Tumeurs solides: colon (DLD-1), poumon (A549), mélanome (WM266.4)

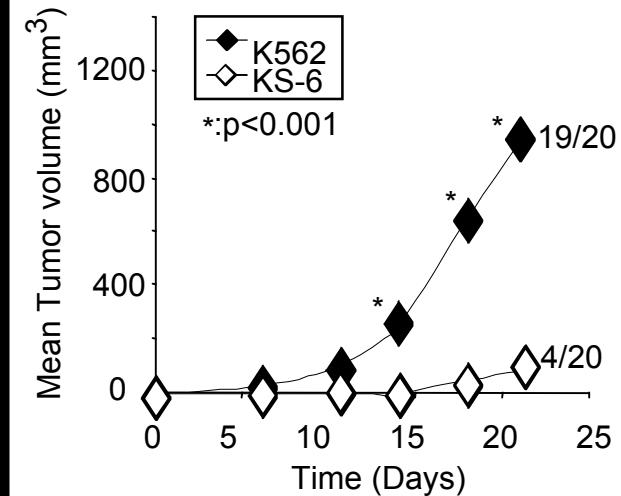
- Caractérisation des modèles révertants

- *In vitro*: Perte de l'indépendance d'ancrage en soft agar
- *In vivo*: Perte de la tumorigénicité dans des souris *scid/scid*



In vitro

Culture en soft agar



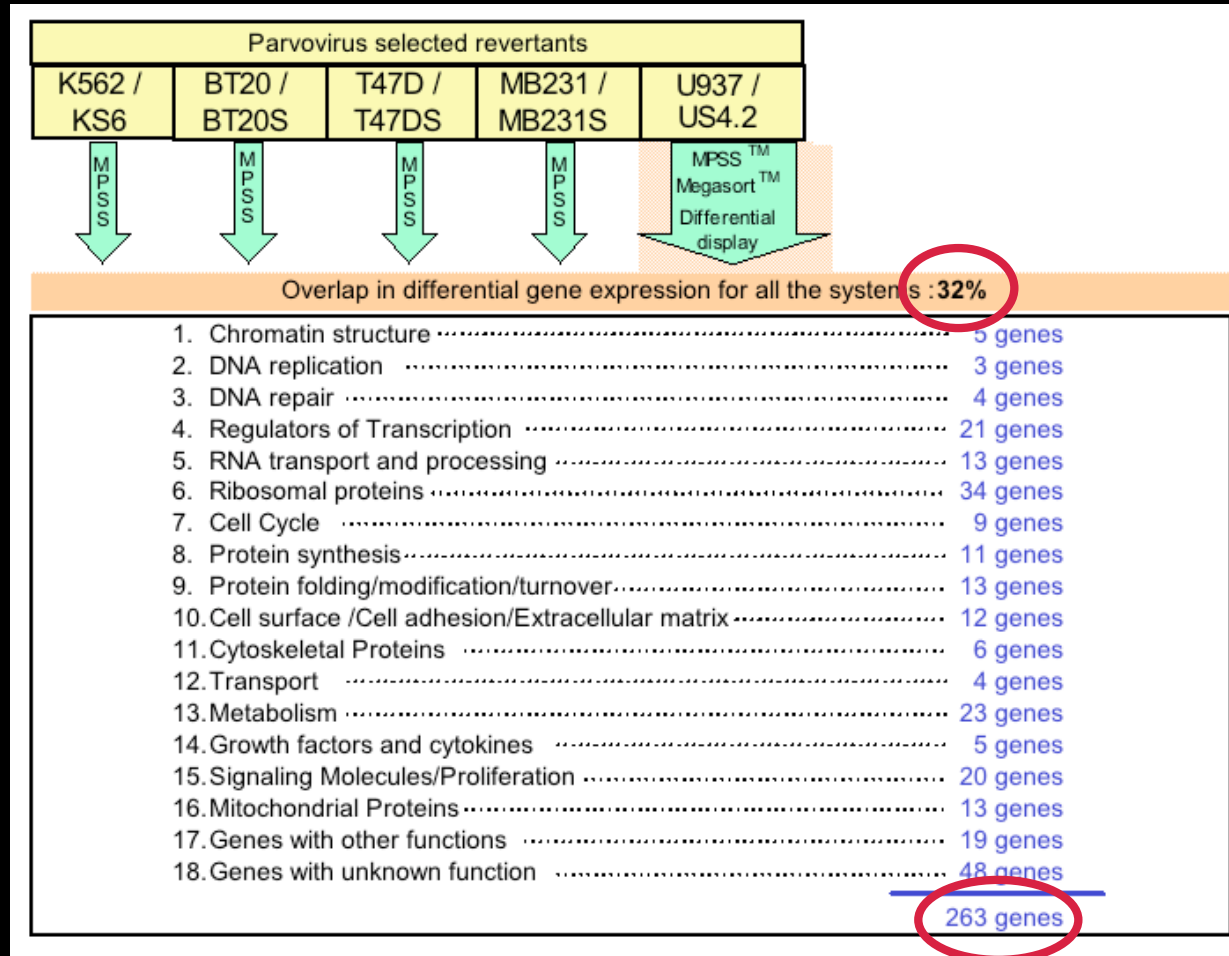
In vivo

Injection dans des souris *scid/scid*

Gènes de la réversion tumorale

- Analyse différentielle de l'expression des gènes

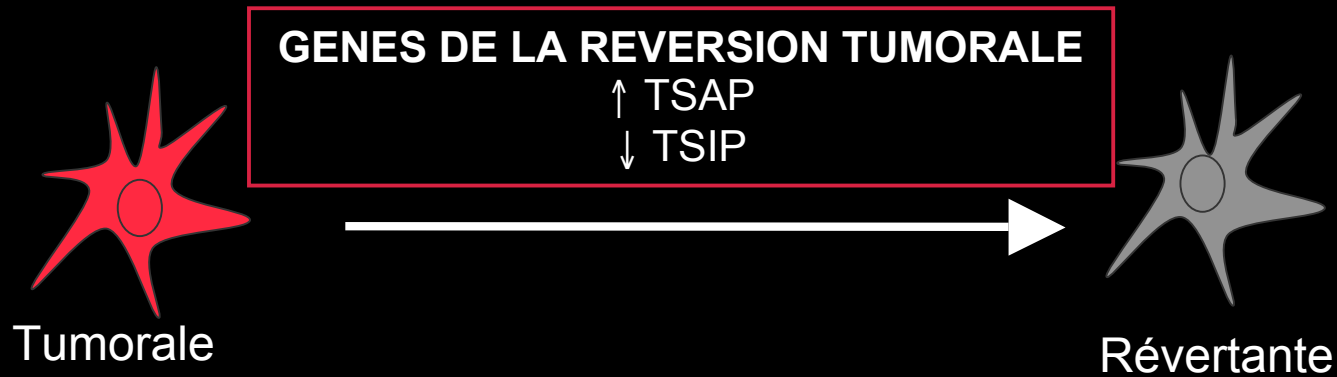
(Amson et al., 1996) (Nemani et al., 1996) (Roperch et al., 1999) (Tuynder et al., 2002)



Les principaux processus vitaux de la cellule sont impliqués dans la réversion tumorale

Objectif de ma thèse

Etude fonctionnelle de deux gènes de la réversion tumorale



- TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6)

- ↑ dans les révertants US et KS issus respectivement de U937 et K562 (*non publié*)

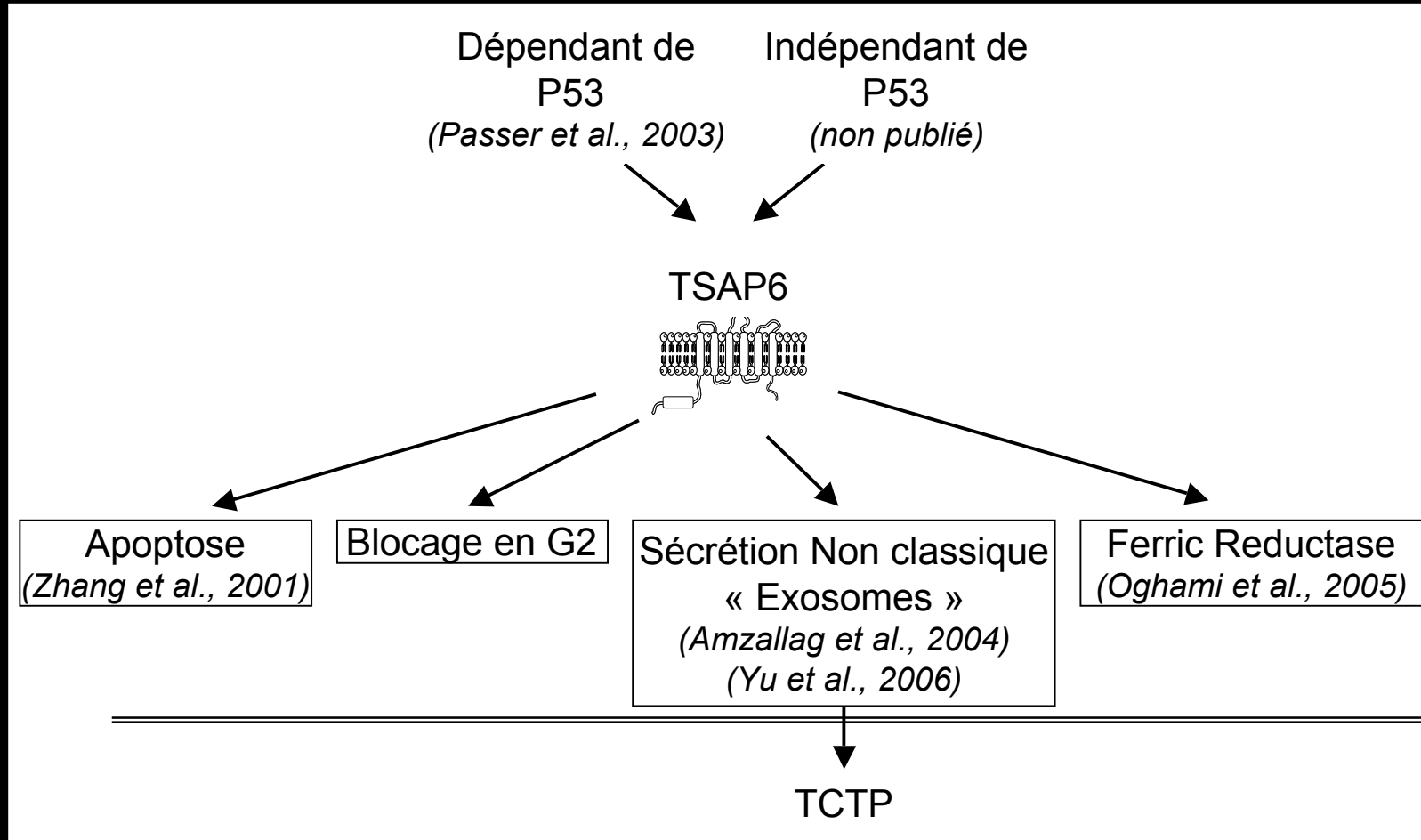
- TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)

- ↓ dans les révertants US et les révertants issus de tumeurs solides (*Tuynder et al., 2002*)

Megasort ⇒ U937/US ⇒ 248/2

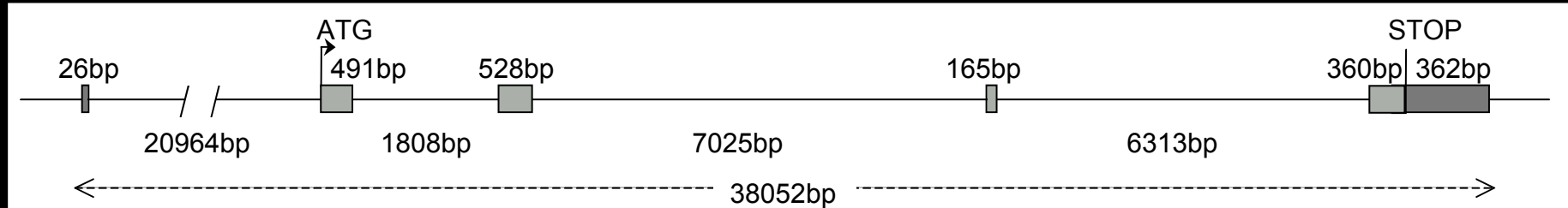
TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6)

Famille des STEAP (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate)



Etude fonctionnelle des souris TSAP6 knockout

- Génération des souris TSAP6 knockout



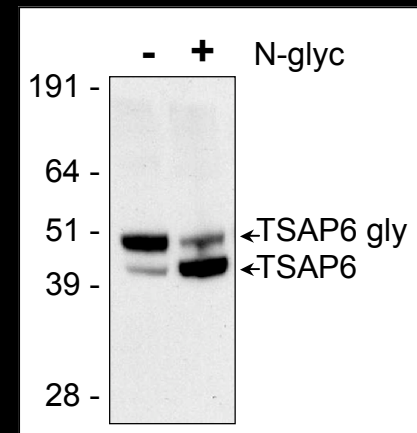
Délétion des exons 2 et 3 dans les souris knockout

- Caractérisation de la protéine TSAP6 chez la souris

- TSAP6 est une protéine glycosylée
- TSAP6 localise avec l'appareil de Golgi et particulièrement avec TGN38
- TSAP6 colocalise avec les protéines des endosomes: Tf-R et EEA1 (Tf-R: récepteur à la transferrine)

- Phénotype des souris TSAP6 knockout

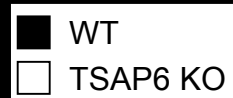
- Rôle de TSAP6 dans ce phénotype



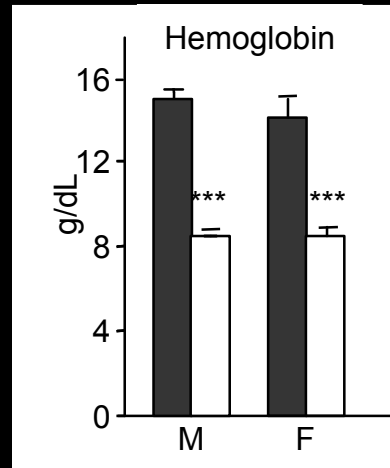
Western-Blot sur lysat total

Phénotype des souris TSAP6 knockout

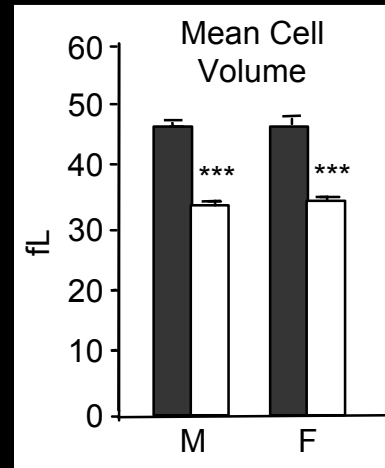
Paramètres sanguins



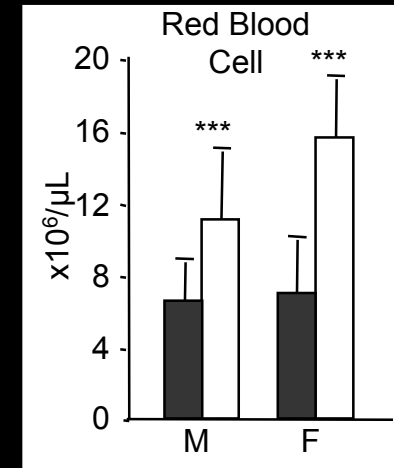
Anémie



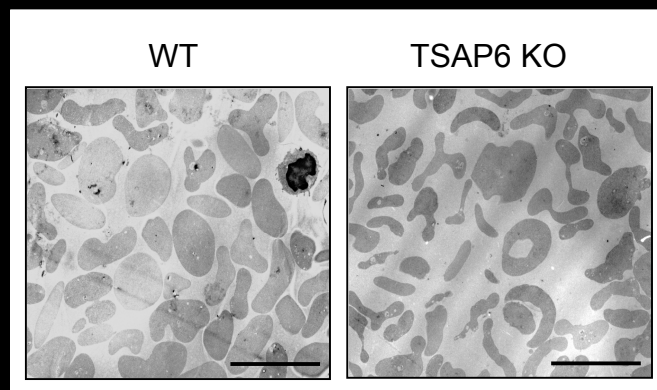
Microcytose



Erythrocytose

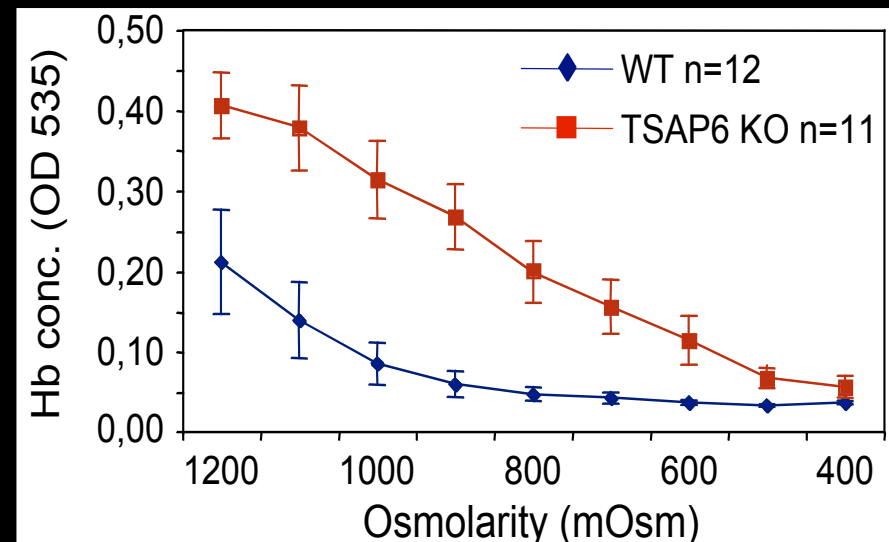


Erythrocytes de tailles et de formes hétérogènes



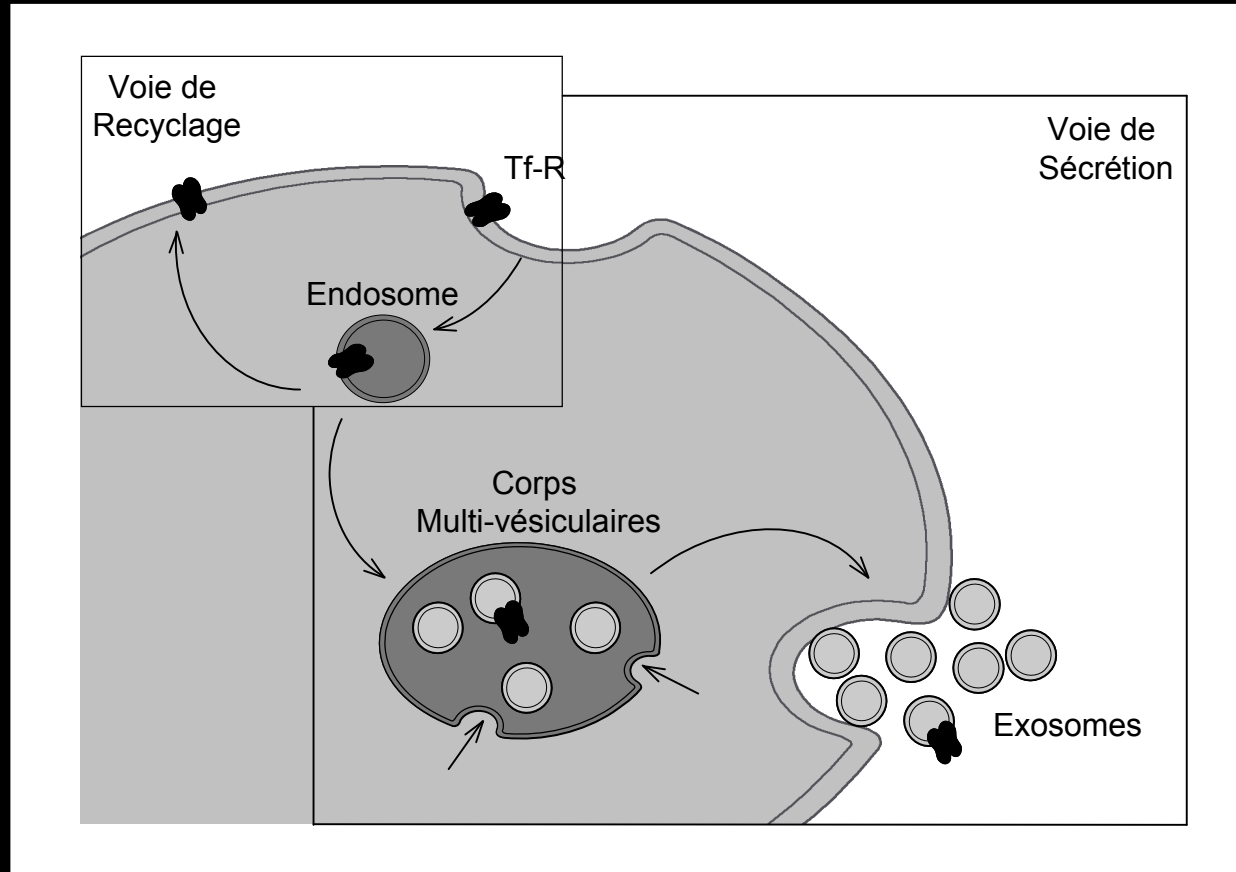
Microscopie électronique

Fragilité osmotique des RBC



Recyclage et élimination du Tf-R par les cellules

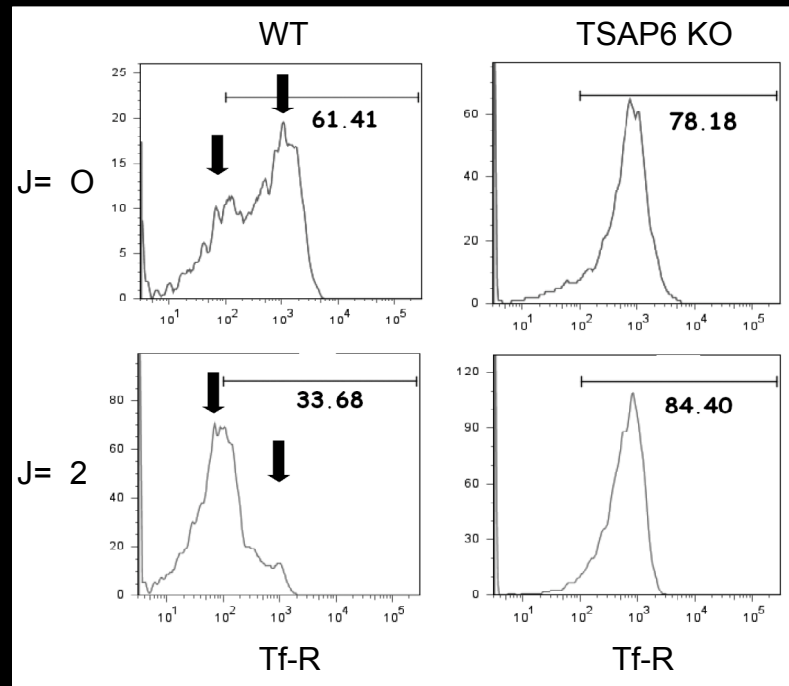
- Voie de recyclage du Tf-R
- Voie de sécrétion du Tf-R (*Pan and Johnstone, 1983*)



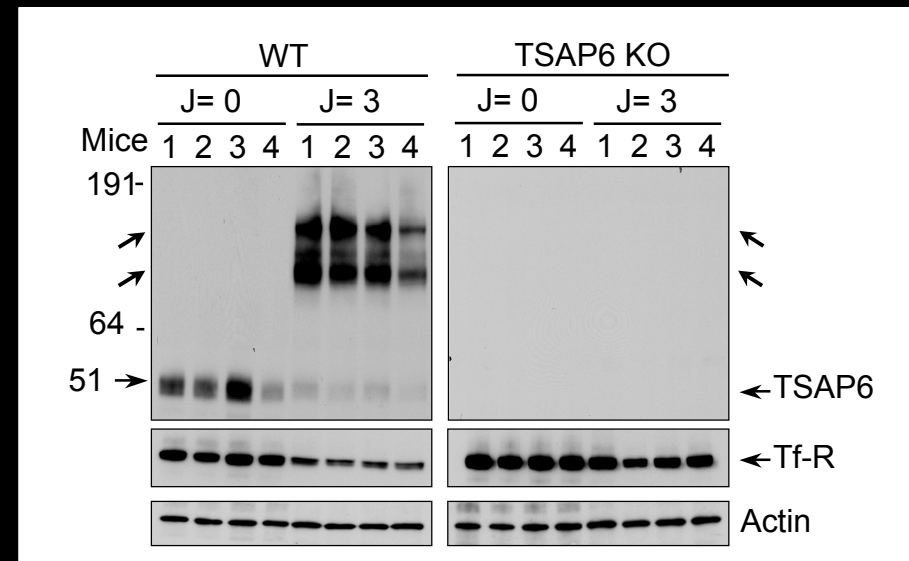
Au cours de la maturation, il y a élimination du Tf-R

Etat du Tf-R dans les érythrocytes

Système de maturation *in vitro*
 Traitement à la Phénylhydrazine



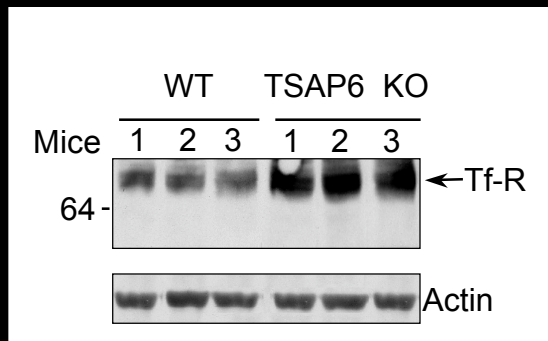
Cytométrie de flux



Western-Blot sur lysat total

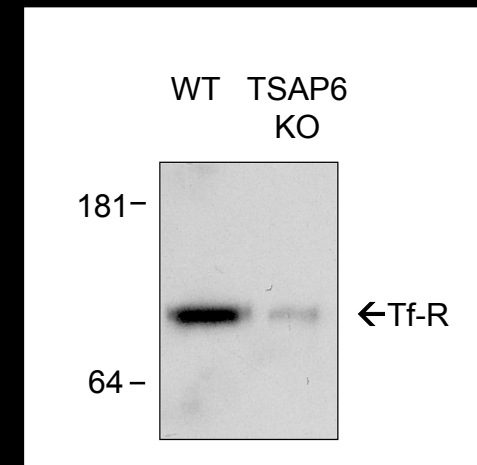
Le Tf-R est retenu dans les érythrocytes TSAP6 KO au cours de la maturation

Sécrétion des exosomes dans les Bone Marrow Dendritic Cells (BMDC)



Western-Blot sur lysat total

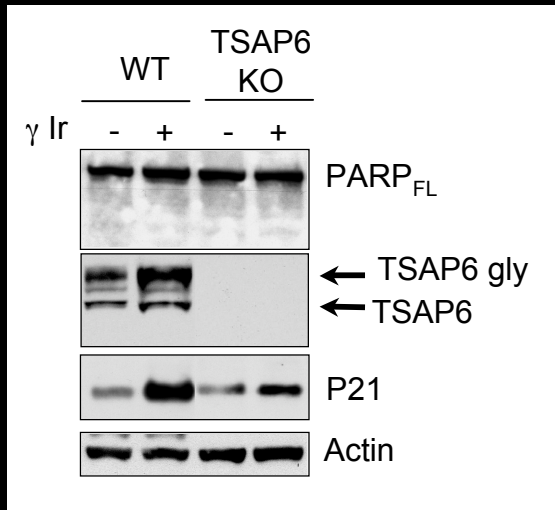
Prod. of exosomal Prot.	
WT	1.16 $\mu\text{g} \pm 0.17$ (n=5)
TSAP6 KO	0.46 $\mu\text{g} \pm 0.17$ (n=6)
<i>WT vs TSAP6 KO, P values = 0.0001</i>	



Western-Blot sur exosomes (2,5 μg)

La sécrétion d'exosomes est déficitaire dans les BMDC TSAP6 KO

Synthèse des exosomes suite à l'activation de TSAP6 dans les cellules de Mouse Embryo Fibroblast (MEFs)



Western-Blot sur lysat total

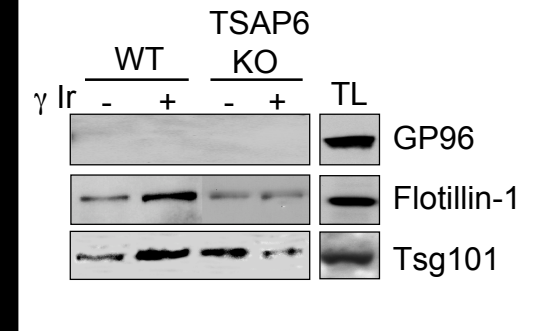
Analyse quantitative

Exosomal prot. from irradiated cells
Exo prot. from not irradiated cells

WT	1.94 ± 0.37	(n=8)
TSAP6 KO	1.12 ± 0.29	(n=8)

WT vs TSAP6 KO, P values = 0.0001

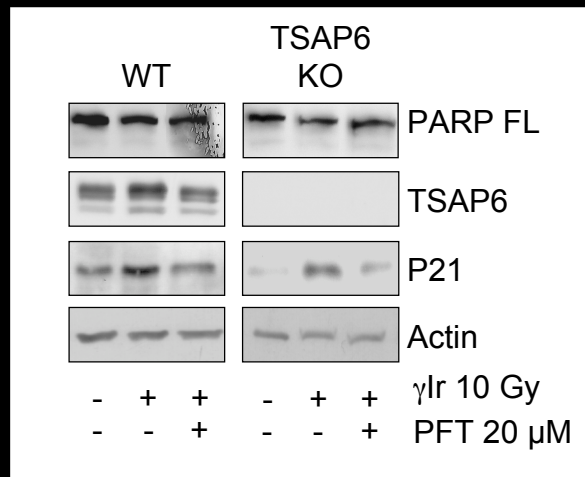
Analyse qualitative



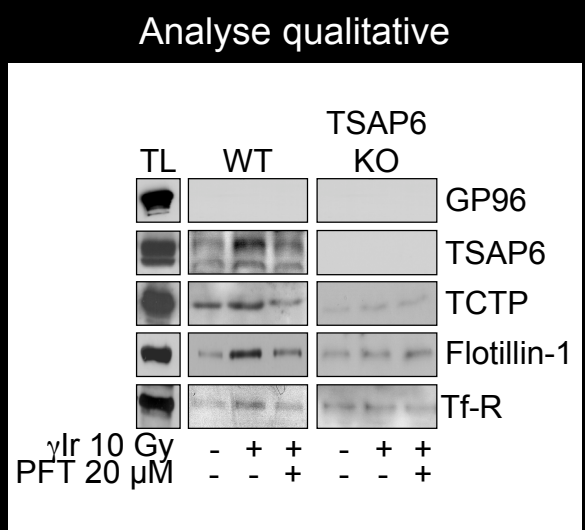
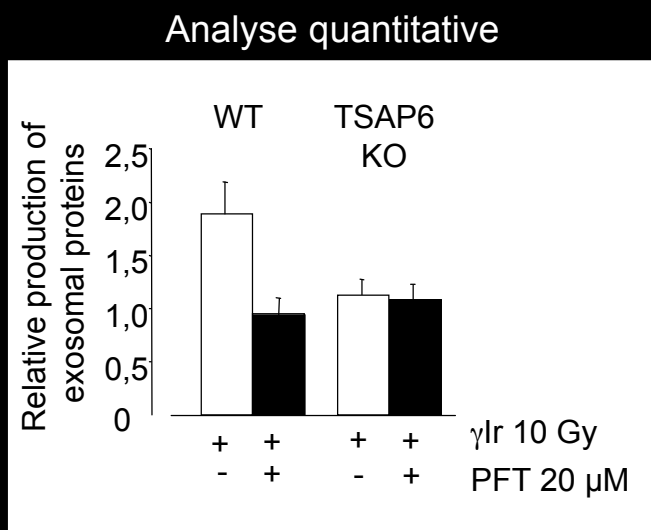
Western-Blot sur exosomes
(0,25 millions de cellules)

La sécrétion des exosomes stimulée par TSAP6 est déficitaire dans les MEFs TSAP6 KO

Sécrétion d'exosomes suite à l'activation de P53 en présence de Pifithrin dans les MEFs



Western-Blot sur lysat total



Western-Blot sur exosomes (2 millions de cellules)

La sécrétion des exosomes induite par TSAP6 et dépendante de P53 est déficitaire dans les MEFs TSAP6 KO

CONCLUSIONS des TSAP6 knockout

ANEMIE



Problème dans la maturation des réticulocytes

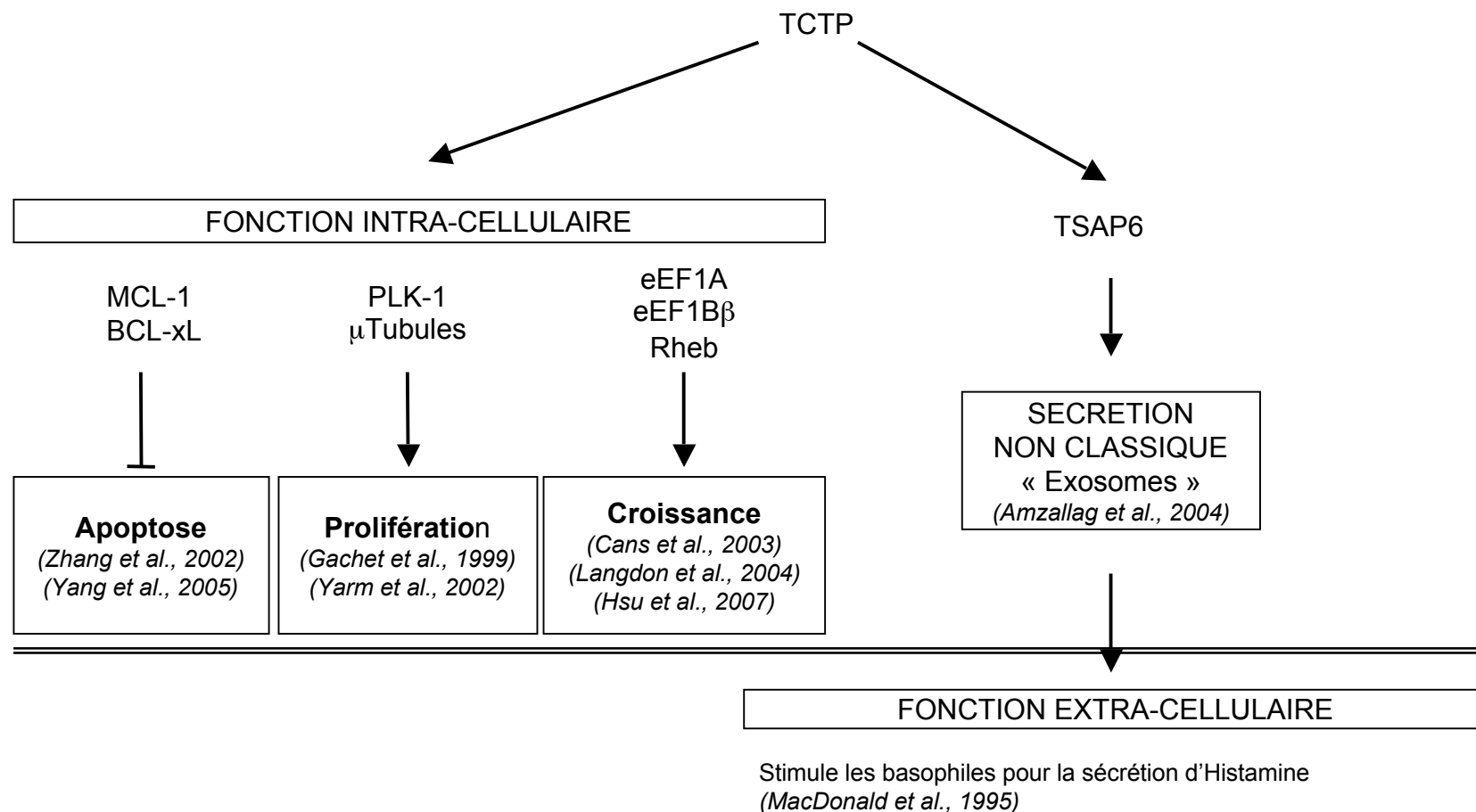


Défaut dans la sécrétion des exosomes

} **TSAP6 au centre de cette
régulation**

TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein)

Protéine multi-fonction

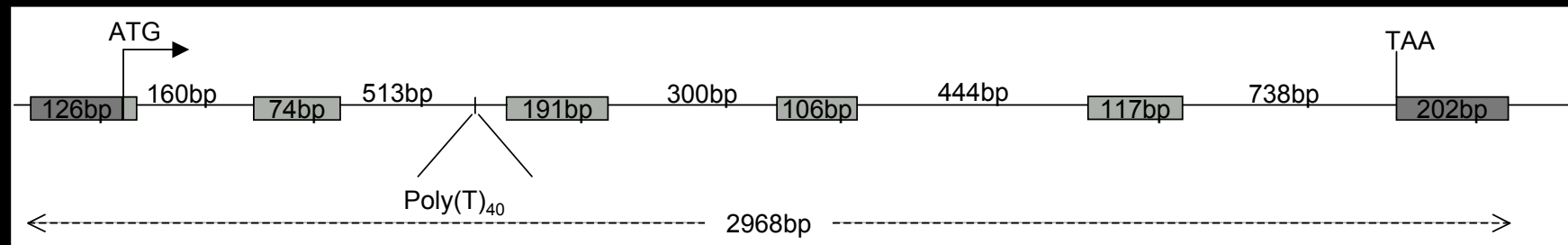


TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing Bax function.

(Susini, Besse, Duflaut, Lespagnol, Beekman et al., 2008)

Etude fonctionnelle des souris TCTP knockout

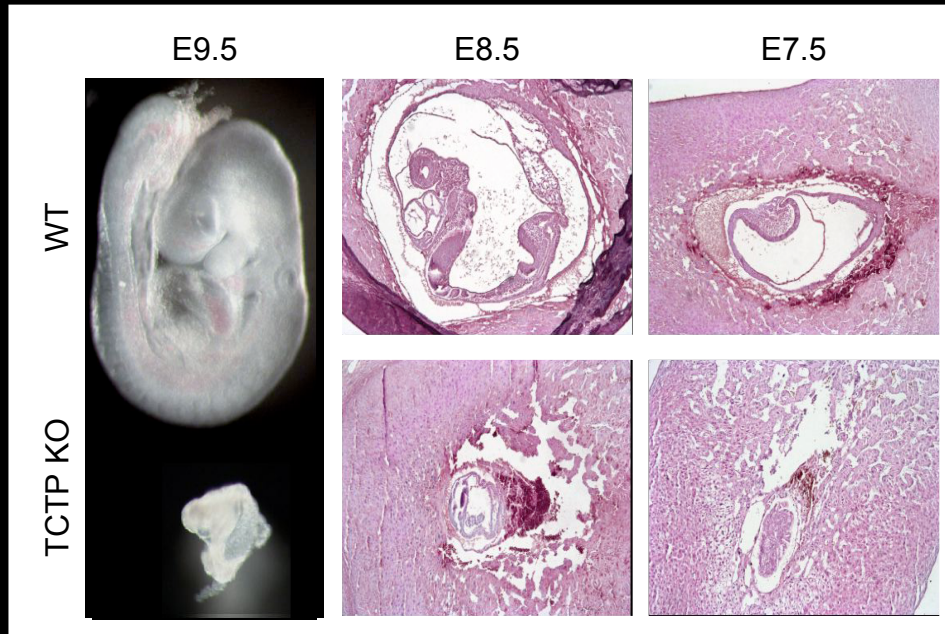
Délétion des exons 3 à 5 dans les souris



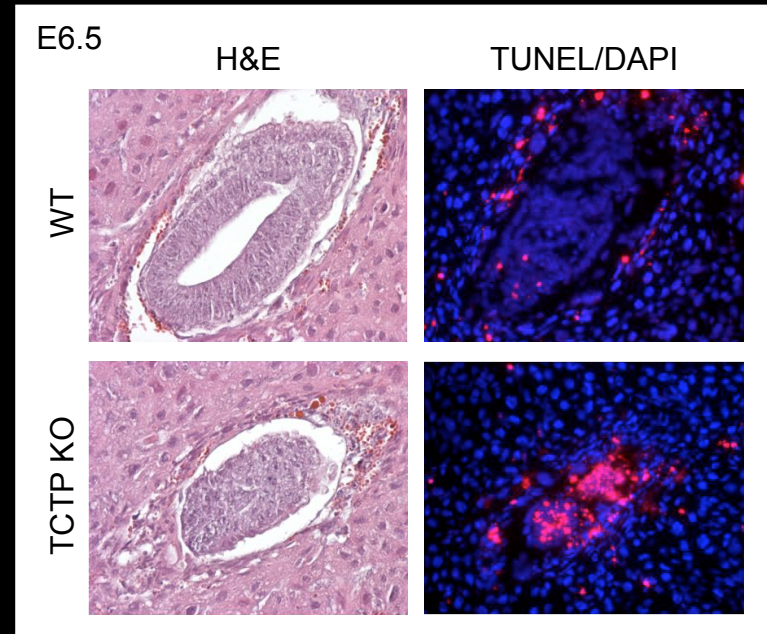
Etude structurale de TCTP par cristallographie

Mécanisme d'action de TCTP dans son rôle de protéine anti-apoptotique

Phénotype des souris TCTP knockout



Coloration par Hematoxylin-eosine (H&E)

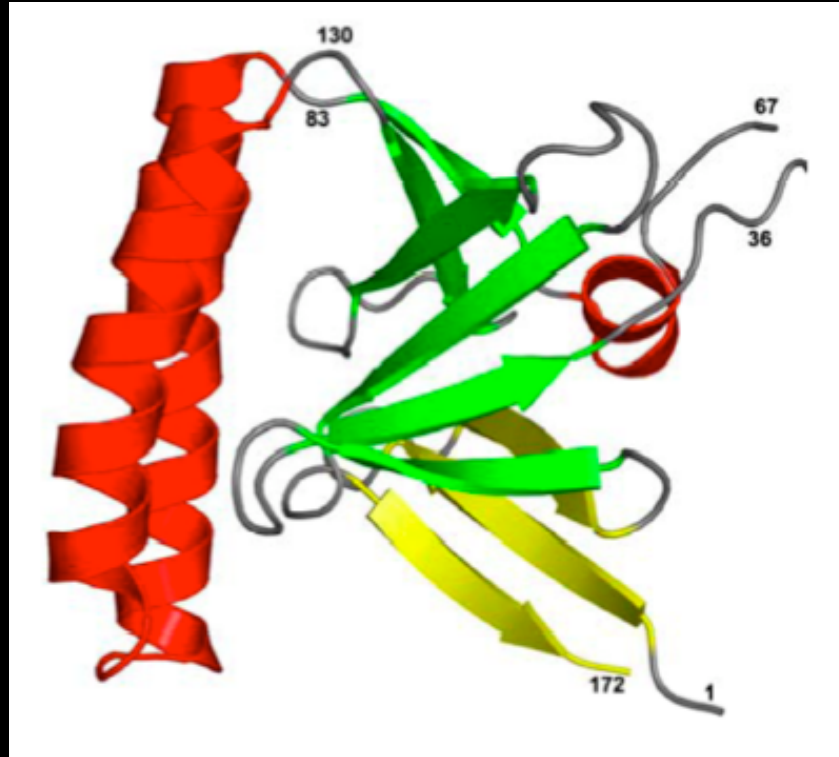


H&E et marquage par TUNEL

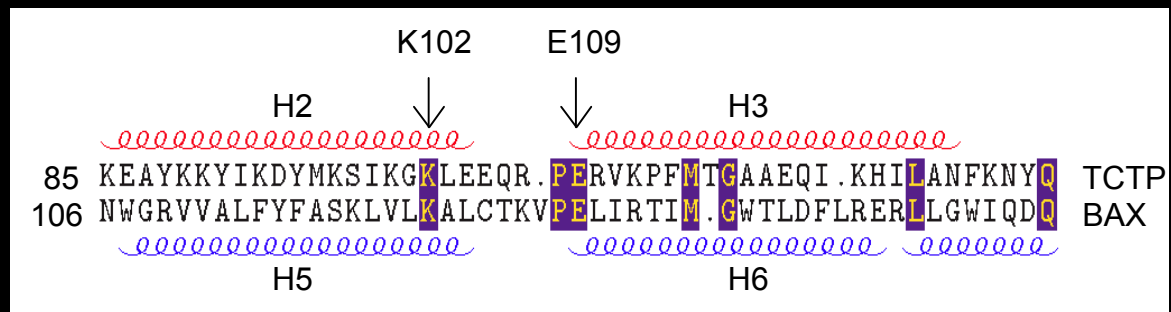
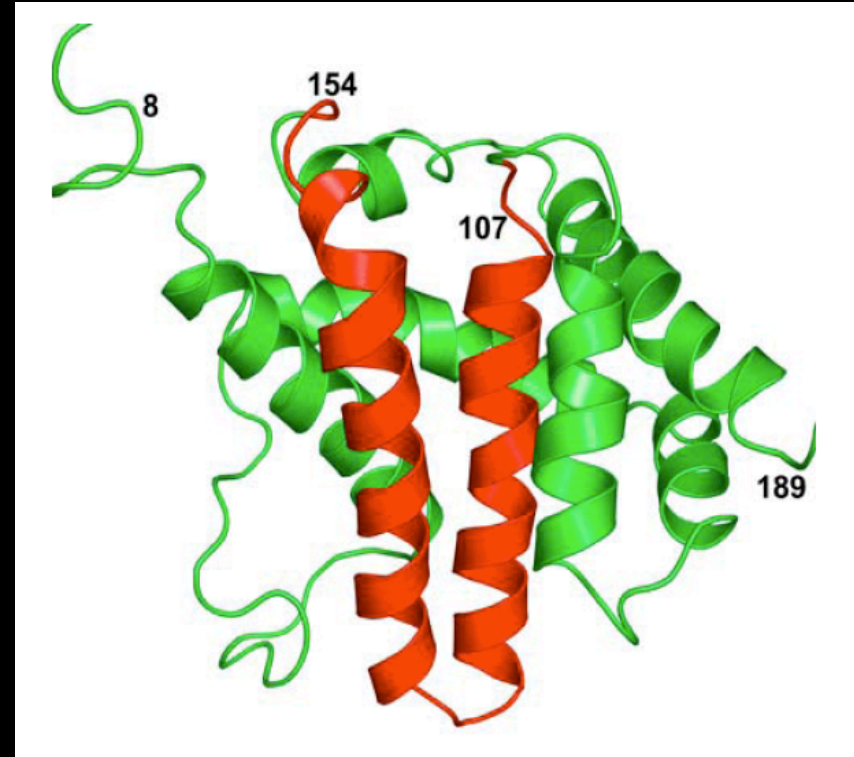
La mort embryonnaire des TCTP KO est due à une forte apoptose

Structure de TCTP humain

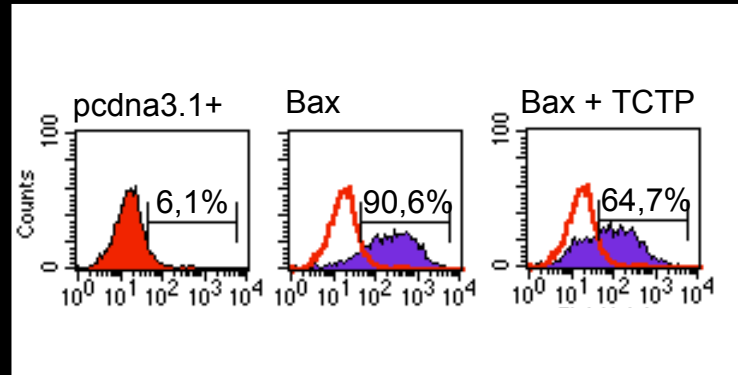
TCTP humain



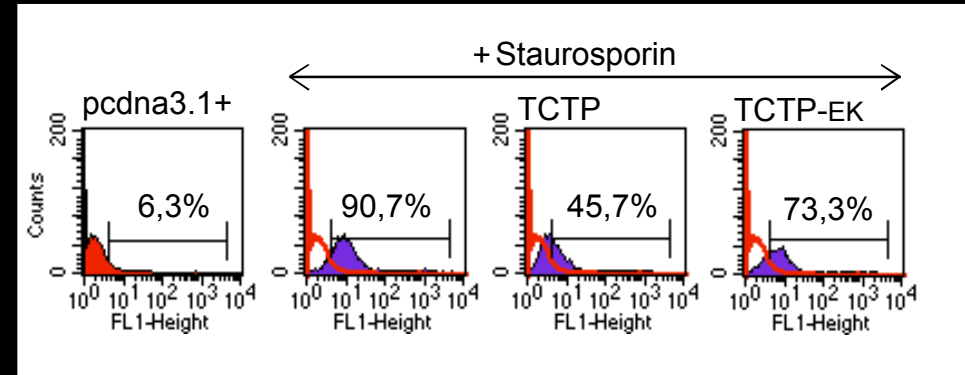
BAX humain



Fonction anti-apoptotique de TCTP



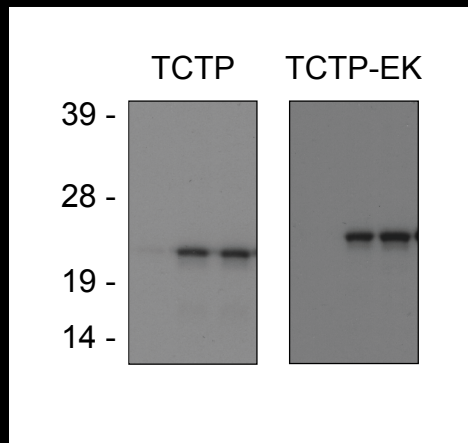
Cytométrie de flux



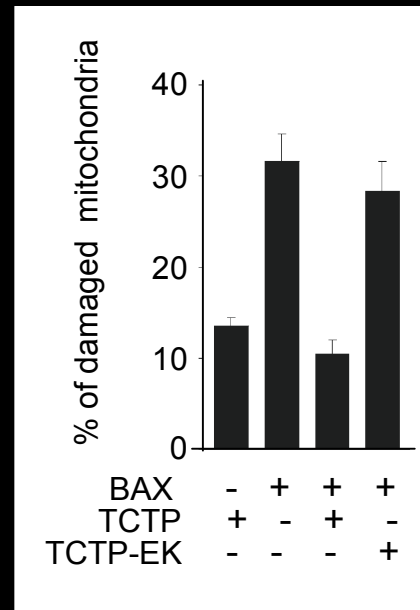
Cytométrie de flux

TCTP inhibe l'apoptose induite par BAX ou la staurosporine
Les hélices H2 et H3 sont responsables de l'effet anti-apoptotique

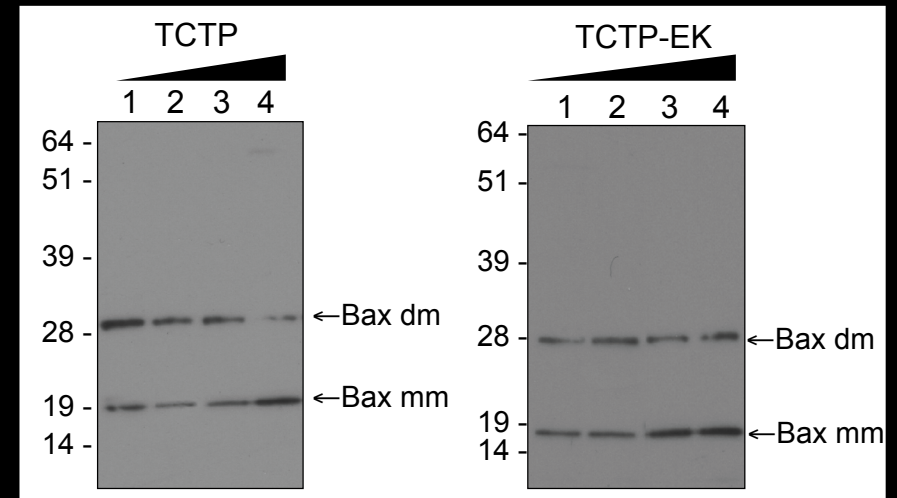
Fonction de TCTP à la mitochondrie



Western-Blot



Relarguage de
Cytochrome-C



Western-Blot

TCTP s'ancre aux mitochondries, la protéine inhibe le relarguage de Cytochrome-C et la dimérisation de BAX à la mitochondrie

CONCLUSIONS des TCTP knockout

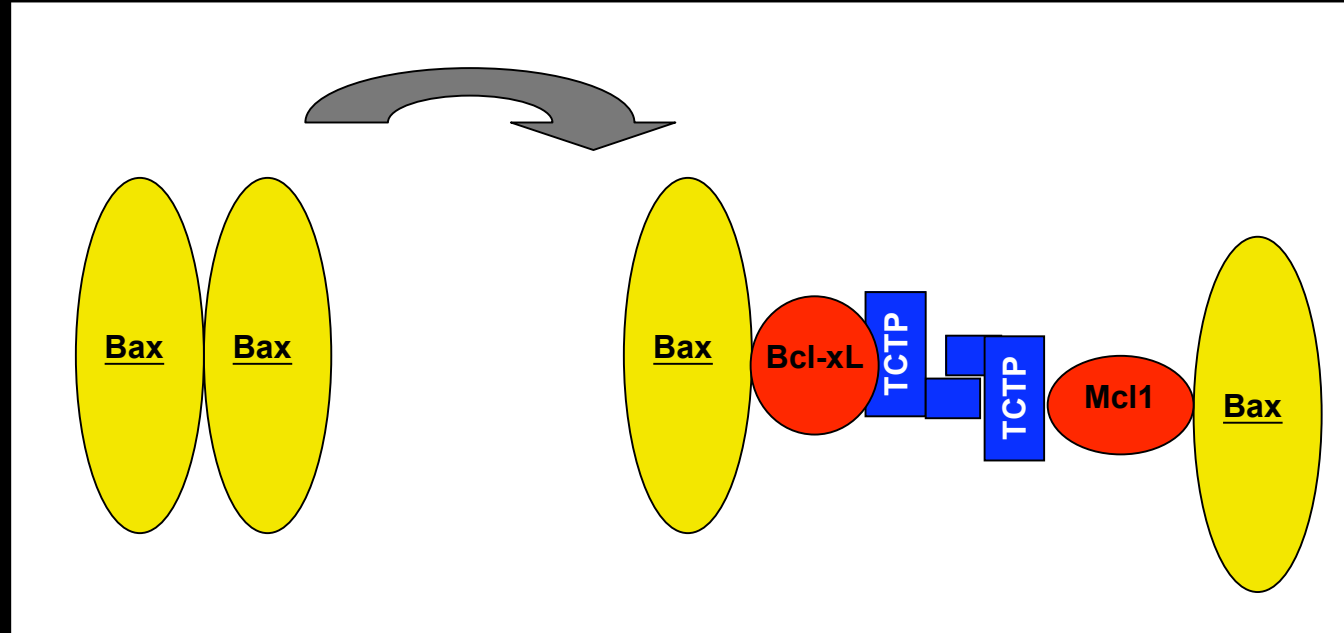
KNOCKOUT

Confirmation *in vivo* du rôle anti-apoptotique de TCTP

STRUCTURE

Homologie de structure avec les hélices H5 et H6 de Bax

FONCTION



TCTP cible thérapeutique potentielle dans le cancer

Pourquoi avoir choisi TCTP?

- gène le plus réprimé dans la plupart des révertants (248/2)
- surexpression dans les tissus cancéreux
- diminution de TCTP induit une réduction du phénotype malin

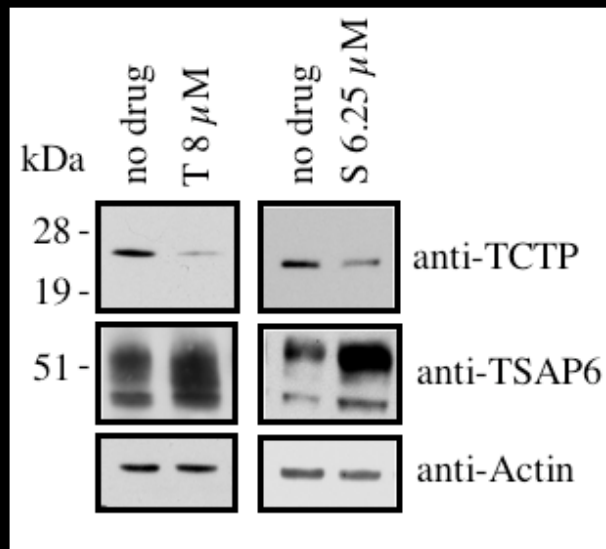
Comment induire la baisse de TCTP?

Comme TCTP induit la sécrétion d'histamine (*MacDonald et al., 1995*), des anti-histaminiques ont été testé pour leur effet sur les cellules cancéreuses puis des composés dont la structure est proche de celles des anti-histaminiques.

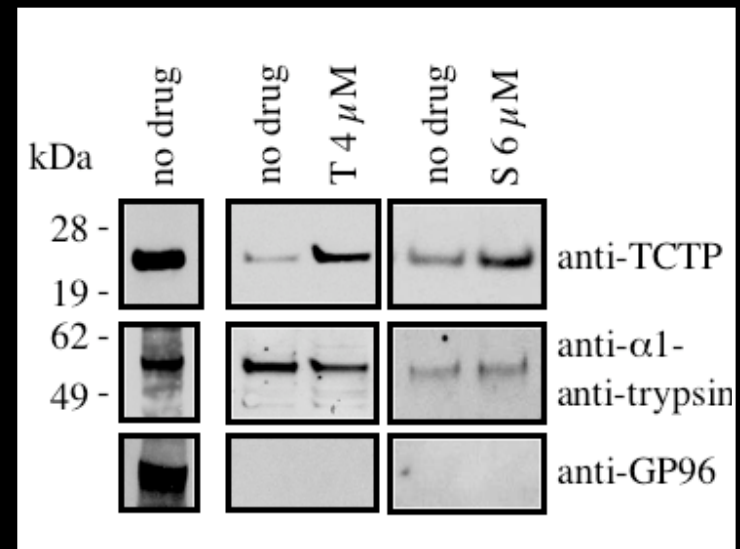
- Induisent la mort des cellules cancéreuses
- Réduisent la formation de tumeur *in vivo*
- Provoquent la baisse de TCTP
- Induisent la transcription de TCTP

Identification de la voie d'élimination de TCTP dans les MEFs

T=Thioridazine
S=Sertraline



Western-Blot sur lysat total



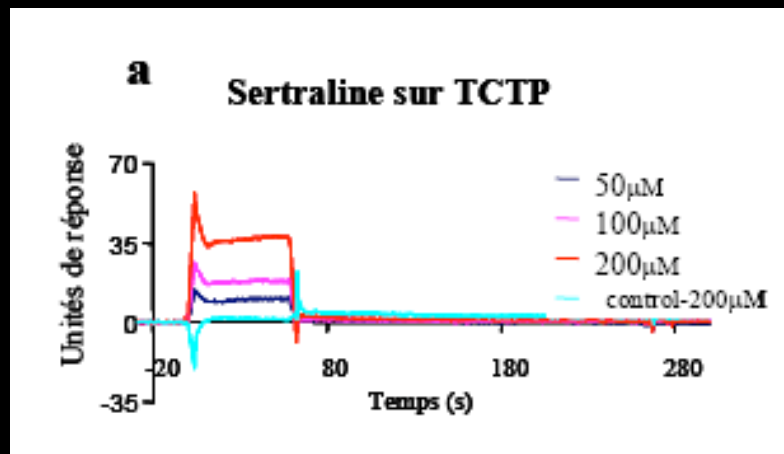
Western-Blot sur surnageant

Sertraline et Thioridazine induisent l'augmentation du niveau de TSAP6 et la sécrétion de TCTP par une voie différente des exosomes

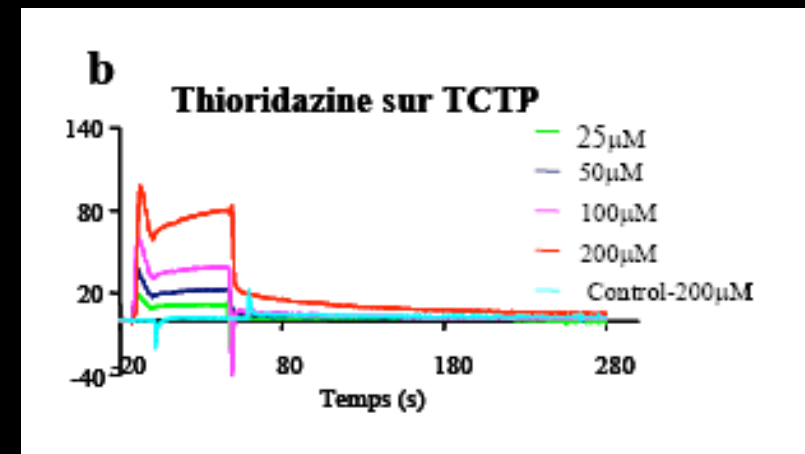
Liaison directe de Sertraline et Thioridazine à TCTP *in vitro*

BIACORE

$K_d = 125\mu\text{M}$



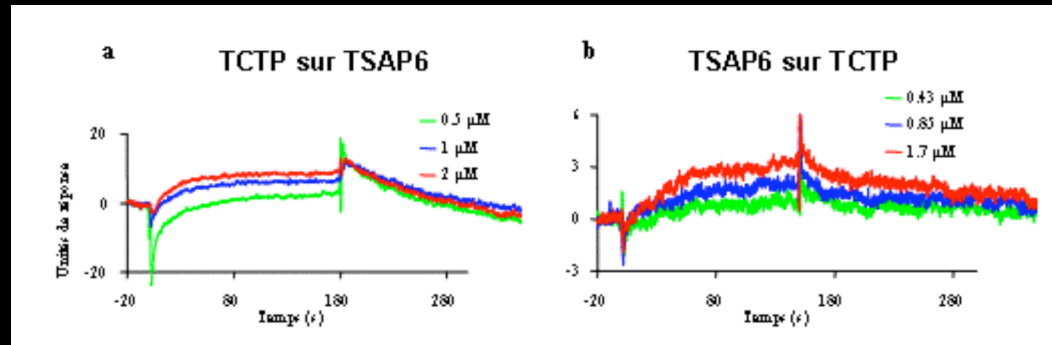
$K_d = 59\mu\text{M}$



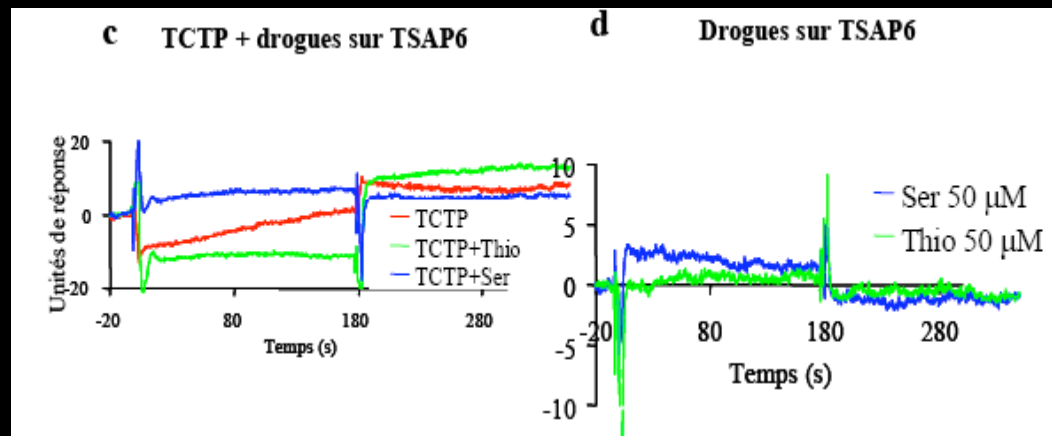
Sertraline et Thioridazine se lient à TCTP *in vitro*

Effet de Sertraline et Thioridazine sur le complexe TSAP6-TCTP *in vitro*

$K_d = 1\mu\text{M}$



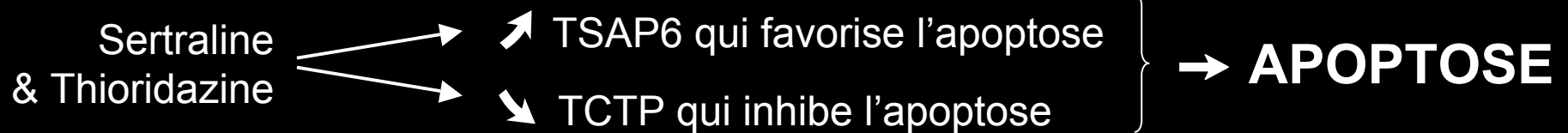
BIACORE



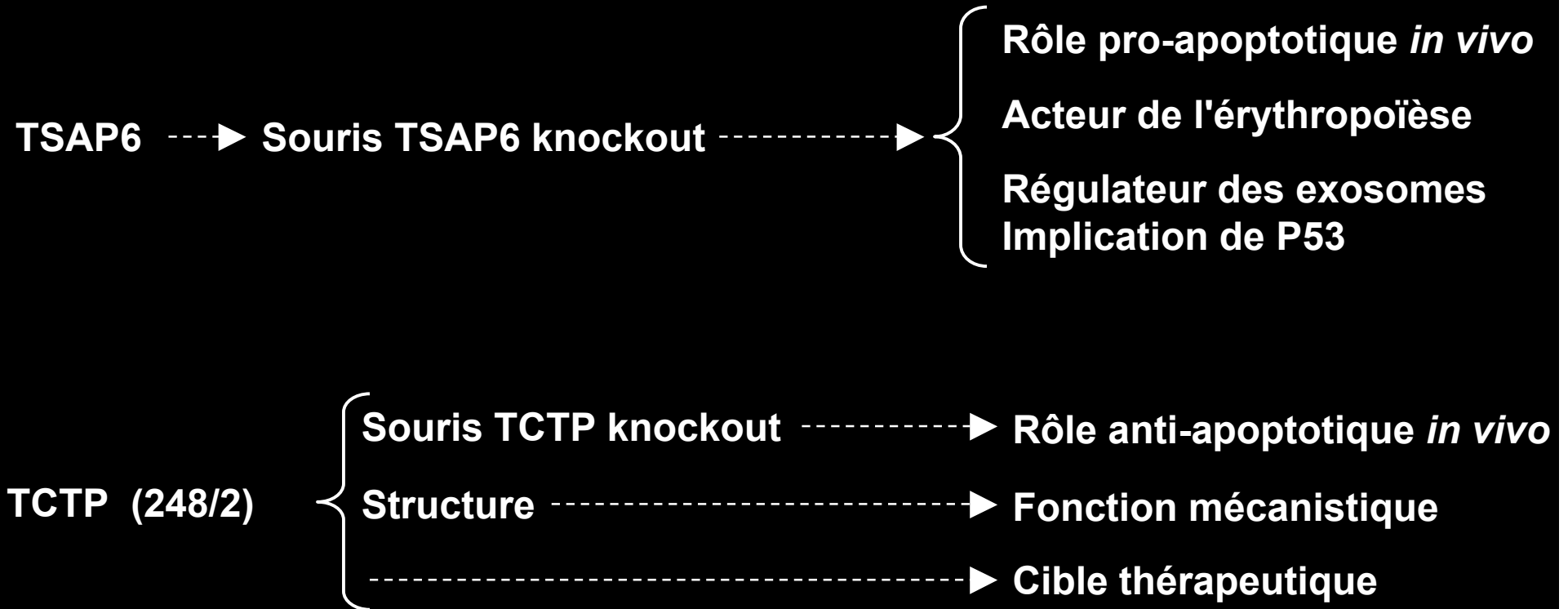
Sertraline et Thioridazine inhibent la liaison entre TSAP6 et TCTP

CONCLUSIONS TCTP cible thérapeutique

- Interaction directe DROGUES/TCTP
- Augmentation de TSAP6 dans les cellules
- Inhibition du complexe TSAP6-TCTP

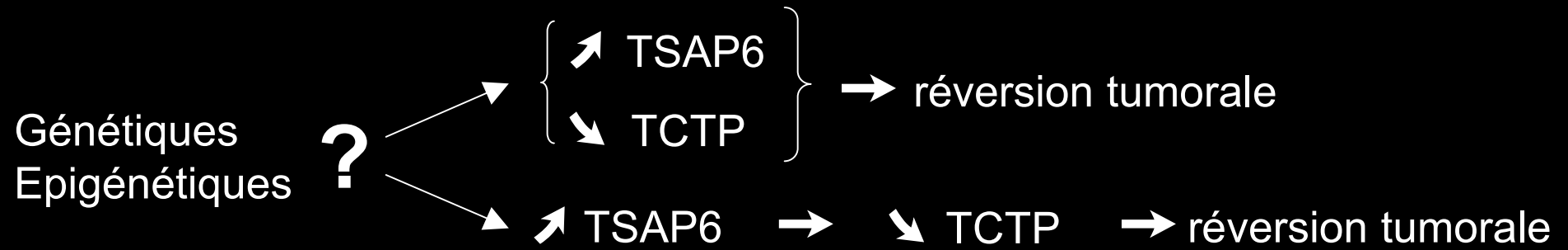


CONCLUSION GENERALE



DISCUSSION et PERSPECTIVES

Au cours de la réversion tumorale



Le rôle des exosomes dans la réversion tumorale
= communication inter-cellulaire

Remerciements

Adam Telerman et Robert Amson

Dominique Duflaut

Laurent Susini

Giusy Fiucci

Stéphanie Besse, Sylvie Prieur et Marcel Tuynder

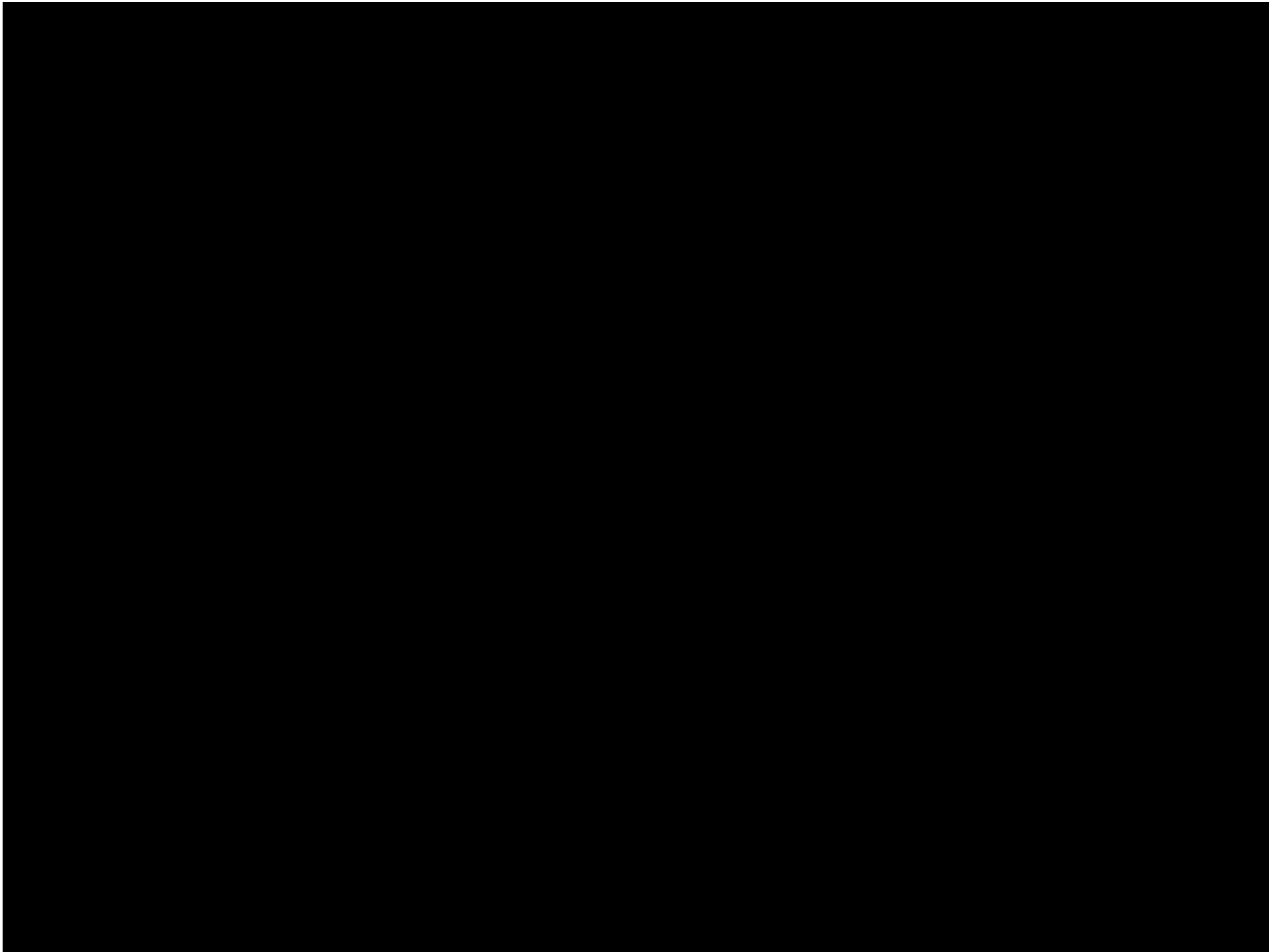
Michel Vidal et Lionel Blanc

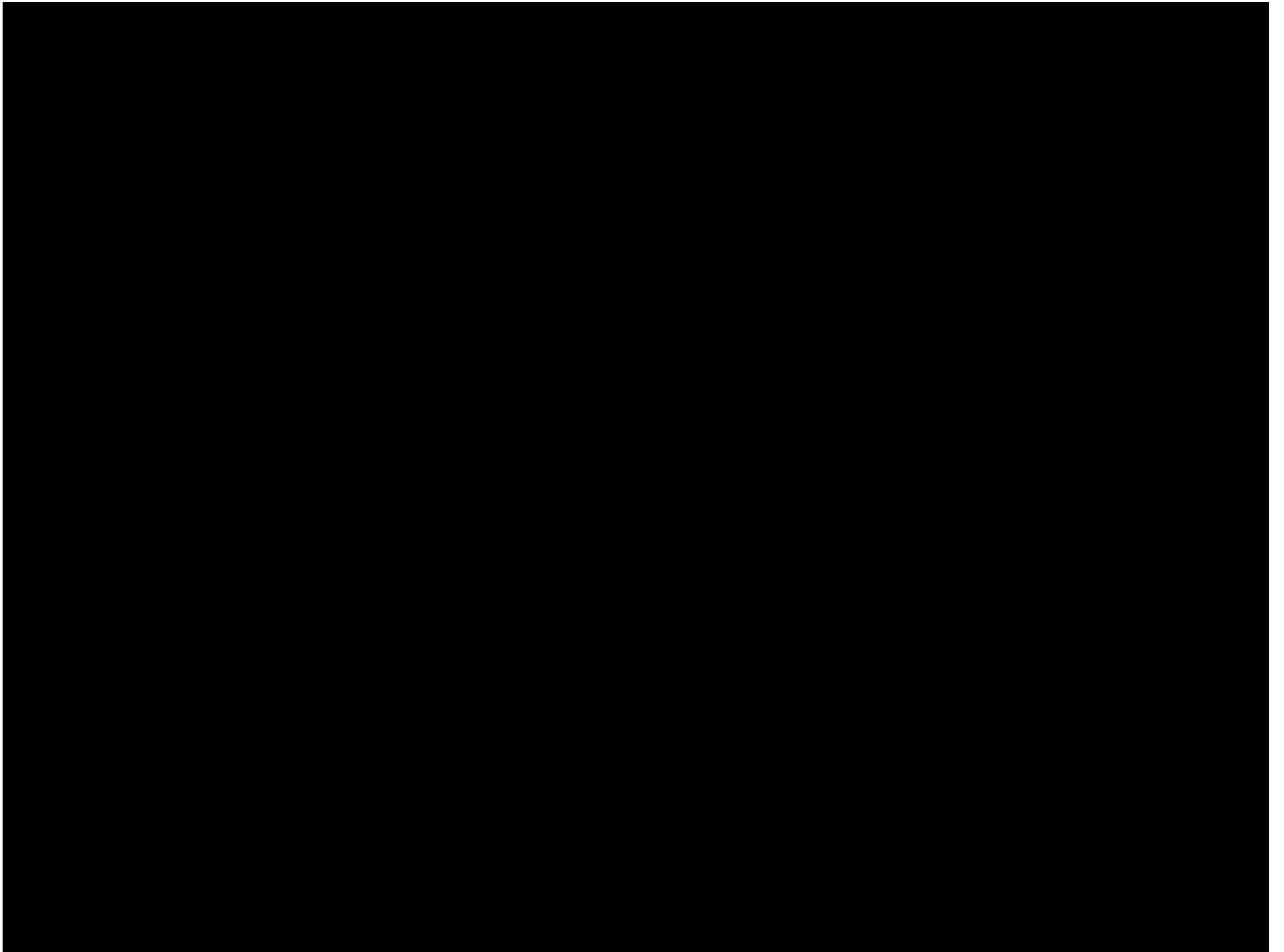
Jean-Christophe Marine et Chantal Beekman

Jean-Claude Martinou

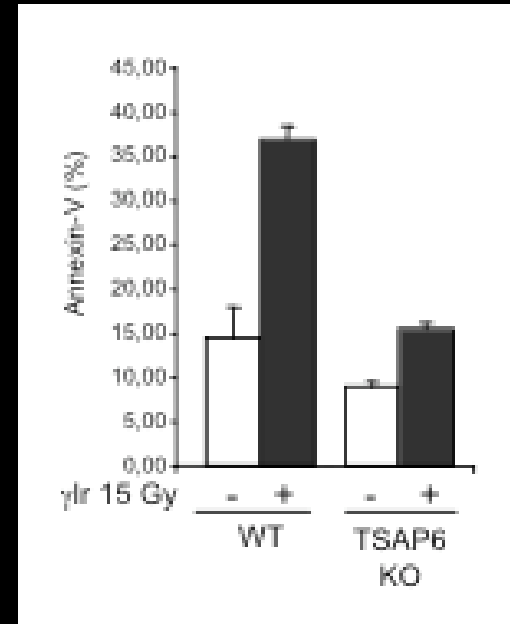
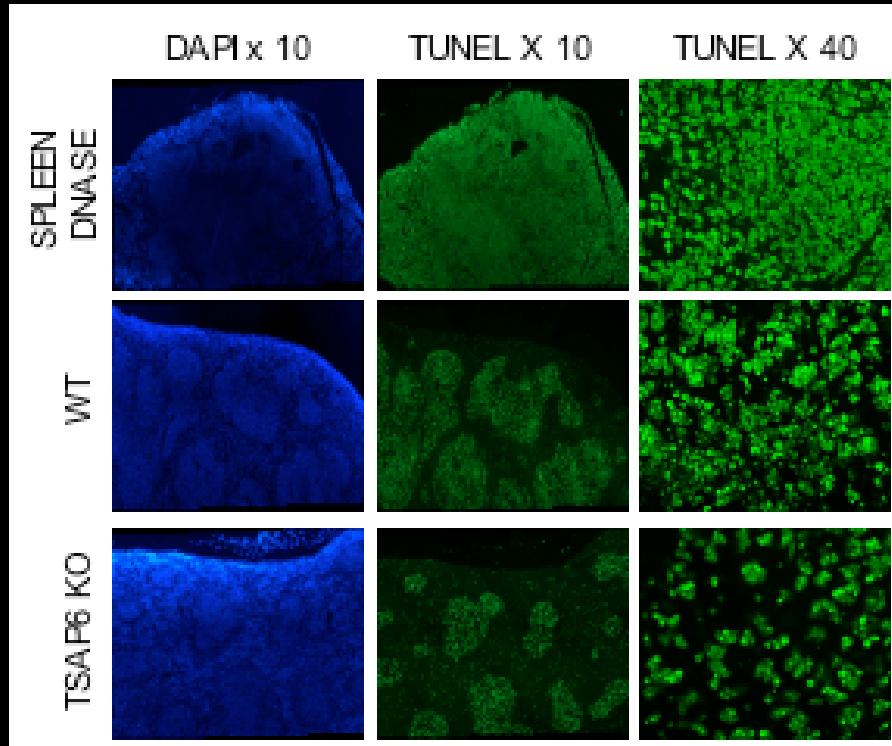
Dino Moras et Jean Cavarelli

Marie-Claude Guillemin, Alain Schmitt, Meriem Garfa





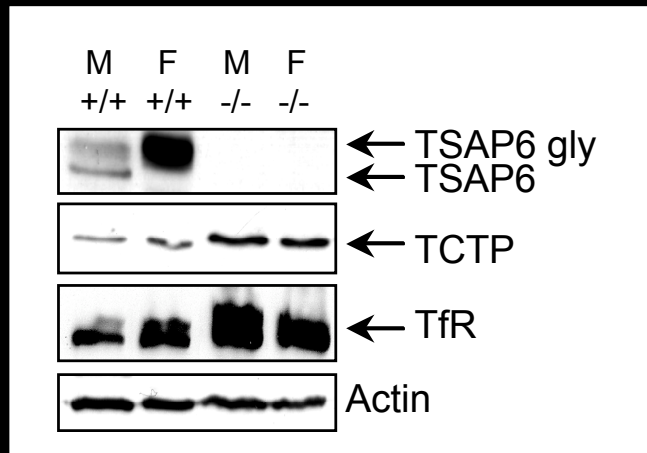
Voie de l'apoptose dans TSAP6 knockout



Cytométrie de flux

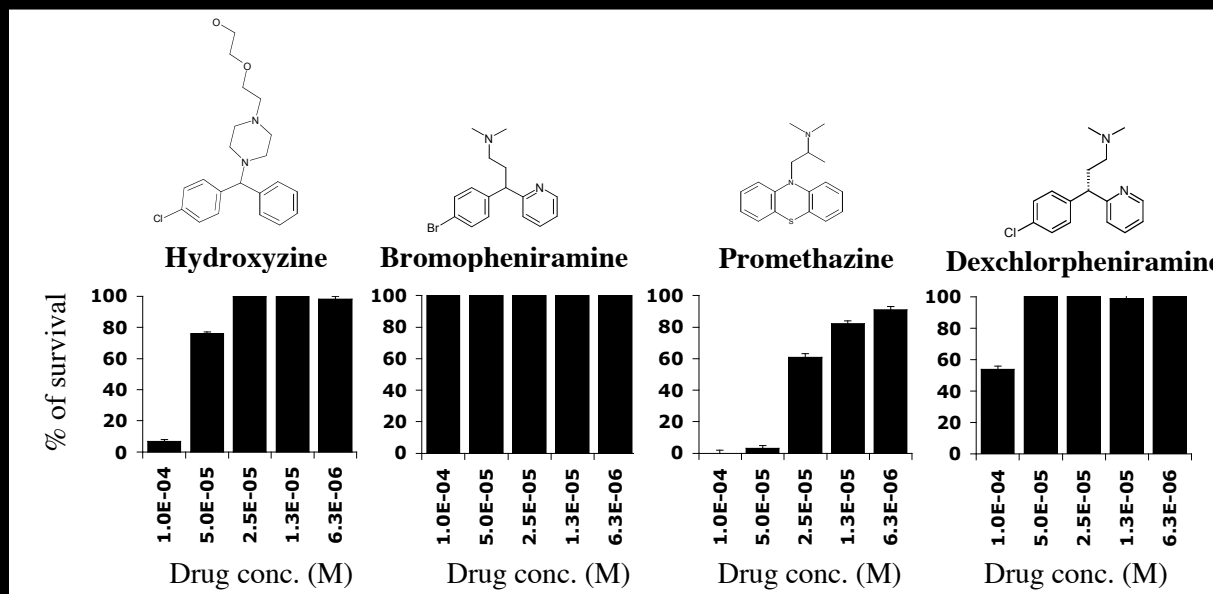
La voie de signalisation de l'apoptose est perturbée dans les TSAP6 KO

Accumulation de protéines sécrétées dans les tissus des TSAP6 KO



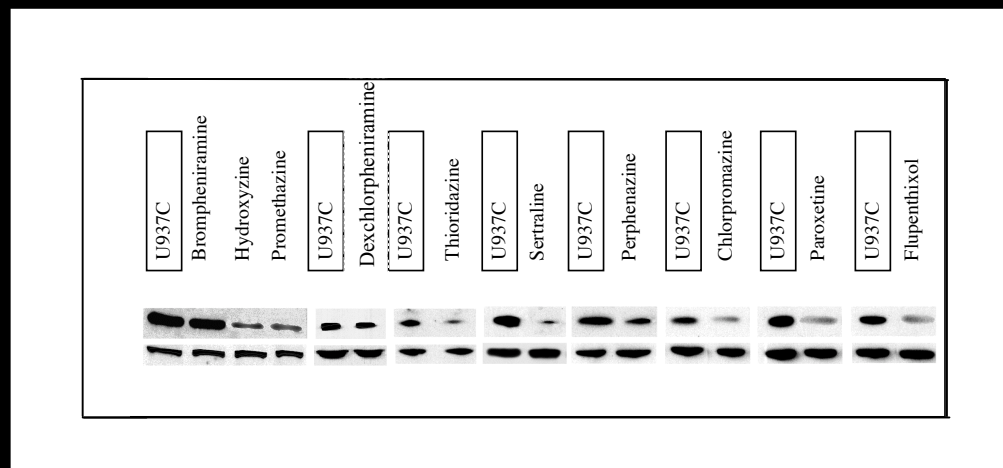
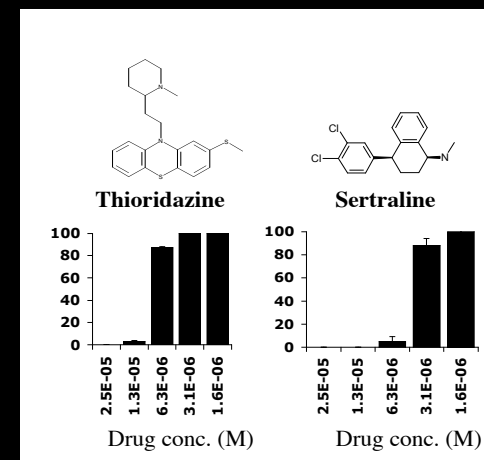
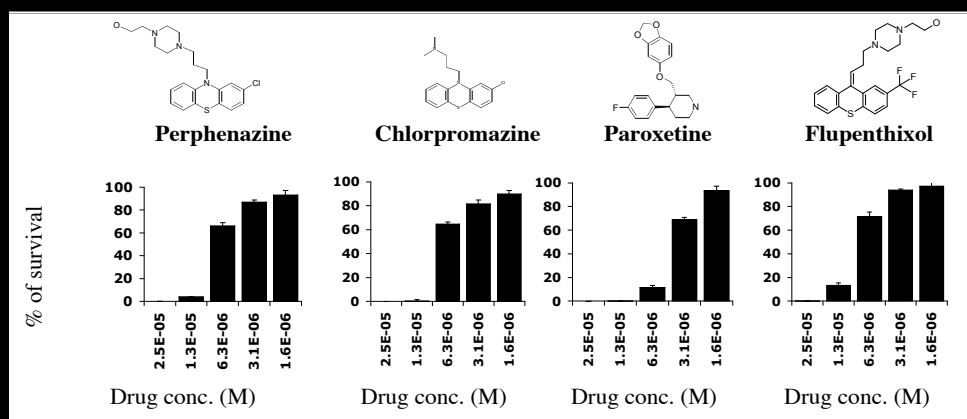
Western-Blot sur lysat total

Composés pharmacologiques tuant des cellules cancéreuses



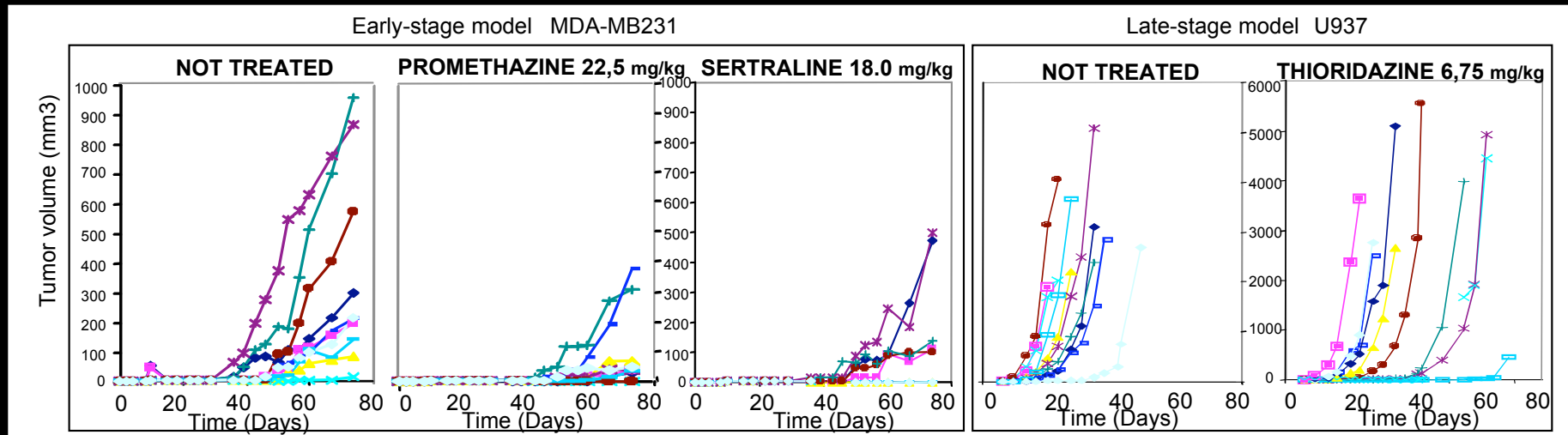
Hydroxyzine = Atarax
 Brompheniramine = Dimegan
 Promethazine = Phenergan
 Dexchlorpheniramine = Polaramine

Composés pharmacologiques tuant des cellules cancéreuses et diminuant l'expression de TCTP



Western-Blot sur lysat total

Composés pharmacologiques tuant des cellules cancéreuses



In vivo

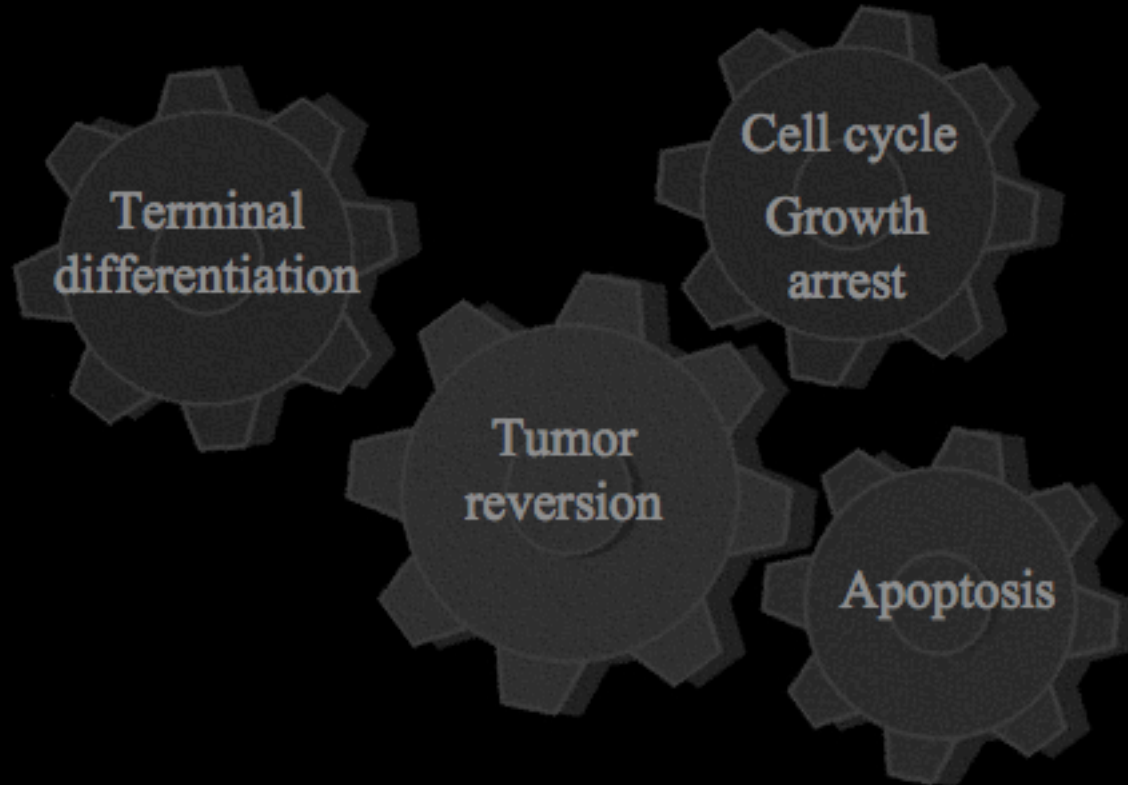
Essais Ex Vivo

ID	FAB	S64		SQ42		S60		S59		A37		i41	
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
JOL	AML1	17%	8%	42%	17%	42%	8%	8%	8%	50%	0%	20%	25%
TRO		32%	0%	59%	20%	13%	8%	35%	5%	41%	25%	30%	0%
MAZ	AML2	31%	12%	83%	16%	91%	12%	48%	7%	67%	25%	68%	34%
DAO		27%	25%	84%	18%	42%	19%	22%	9%	62%	21%	38%	35%
LAM		26%	3%	26%	46%	51%	35%	37%	0%	43%	6%	40%	0%
CHA	AML4	42%	36%	53%	39%	48%	6%	51%	33%	50%	39%	55%	33%
LAI	AML3	35%	24%	35%	11%	89%	13%	24%	13%	54%	19%	85%	24%
ROY		45%	0%	82%	15%	95%	12%	53%	3%	63%	3%	50%	30%
PIN		50%	18%	72%	36%	56%	0%	44%	14%	56%	12%	46%	38%
NAK		35%	0%	79%	38%	38%	0%	71%	11%	97%	53%	97%	23%
PEN	AML5	57%	7%	68%	46%	43%	39%	25%	32%	32%	39%	75%	36%
BRU		54%		73%		88%		51%		76%		55%	
IMA		47%	0%	42%	11%	62%	15%	31%	13%	53%	53%	40%	24%
MAR		23%	18%	38%	25%	15%	25%	40%	38%	33%	35%	25%	23%
CAR		17%	8%	78%	0%	27%	0%	20%	17%	41%	9%	27%	16%
MEAN		36%	11%	61%	24%	53%	14%	37%	15%	55%	24%	50%	24%

% inhibition viabilité

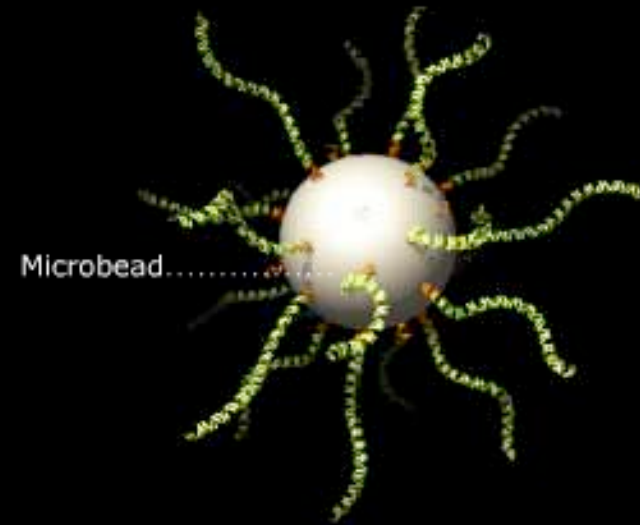
Définition de la réversion tumorale

Tumor reversion can be defined at the molecular level, not just as the reversal of malignant transformation, but as a biological process in its own right involving a cellular reprogramming mechanism, overriding genetic changes in cancer, by triggering an alternative pathway leading to suppression of tumorigenicity.



Lynx MPSS™ (massively parallel signature sequencing)

ID	Signature Sequence	Abundance
1	G A T C T C C T G G G A T A A A C T G C	3
2	G A T C A T T T A T G T G T C T T T G T	5
3	G A T C C A C A A G A A G C T C A A A C	8
4	G A T C C G T A A G A T T C C T G A A T	10
5	G A T C C A G T T A A C A A C A A T A G	17
6	G A T C C T G T G G C T A A C A A T C G	25
7	G A T C G A A G G T G T A T G T G G G A	29
8	G A T C T A C T T G T G G T T T T T T C	36
9	G A T C G A A A G A C G A T A A A A C A	63
10	G A T C G A A A T G T T G G C T A A T A	66
11	G A T C T A T T T G G T A A T G G T G T	75
12	G A T C T C G T C G A A G A C T C T A G	180
13	G A T C G A C T C T C T T A T G G T C C	189
14	G A T C T A C A C A C A C A T T C A C C	505
15	G A T C G G A T A A C T A T C T G T C A	1119
16	G A T C C T T C G G A T G T T G A C A T	2138



The level of expression for each gene is obtained by counting the number of beads that have the same 17 bases of DNA sequence.

Lynx MPSS™ (massively parallel signature sequencing)

MPSS™ technology enables the simultaneous identification of nearly all the DNA molecules in a sample

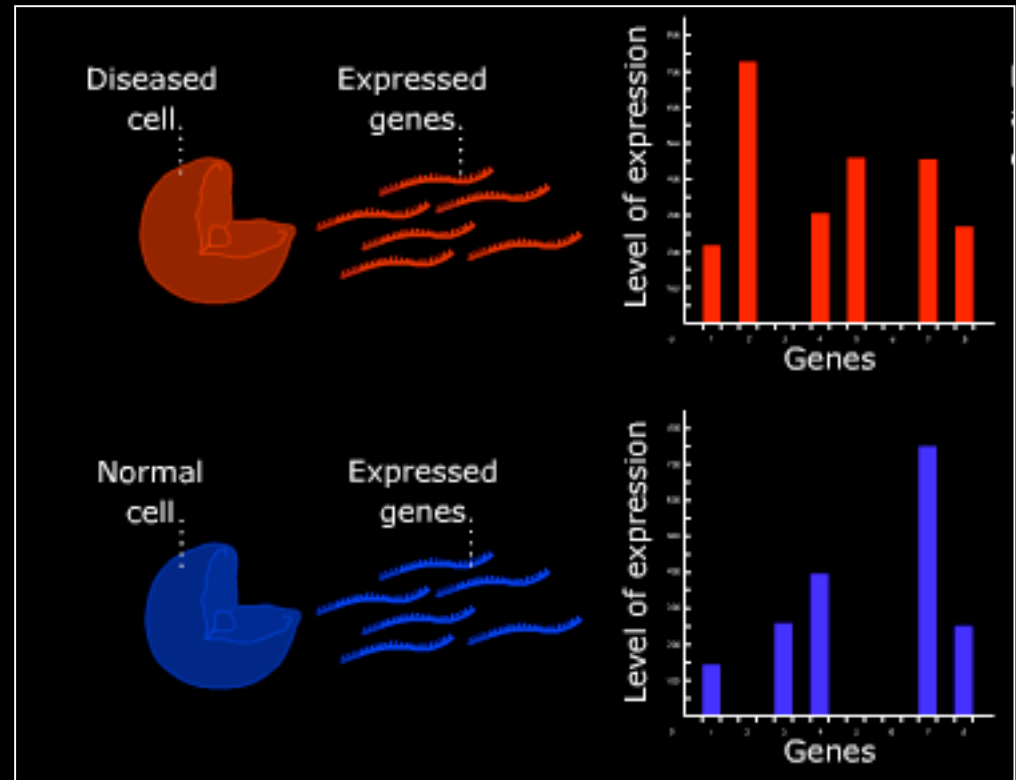
Polyadenylated RNA

Only sequence a short part of each cDNA molecule that is long enough to allow identification of the original transcript.

Use a single restriction enzyme

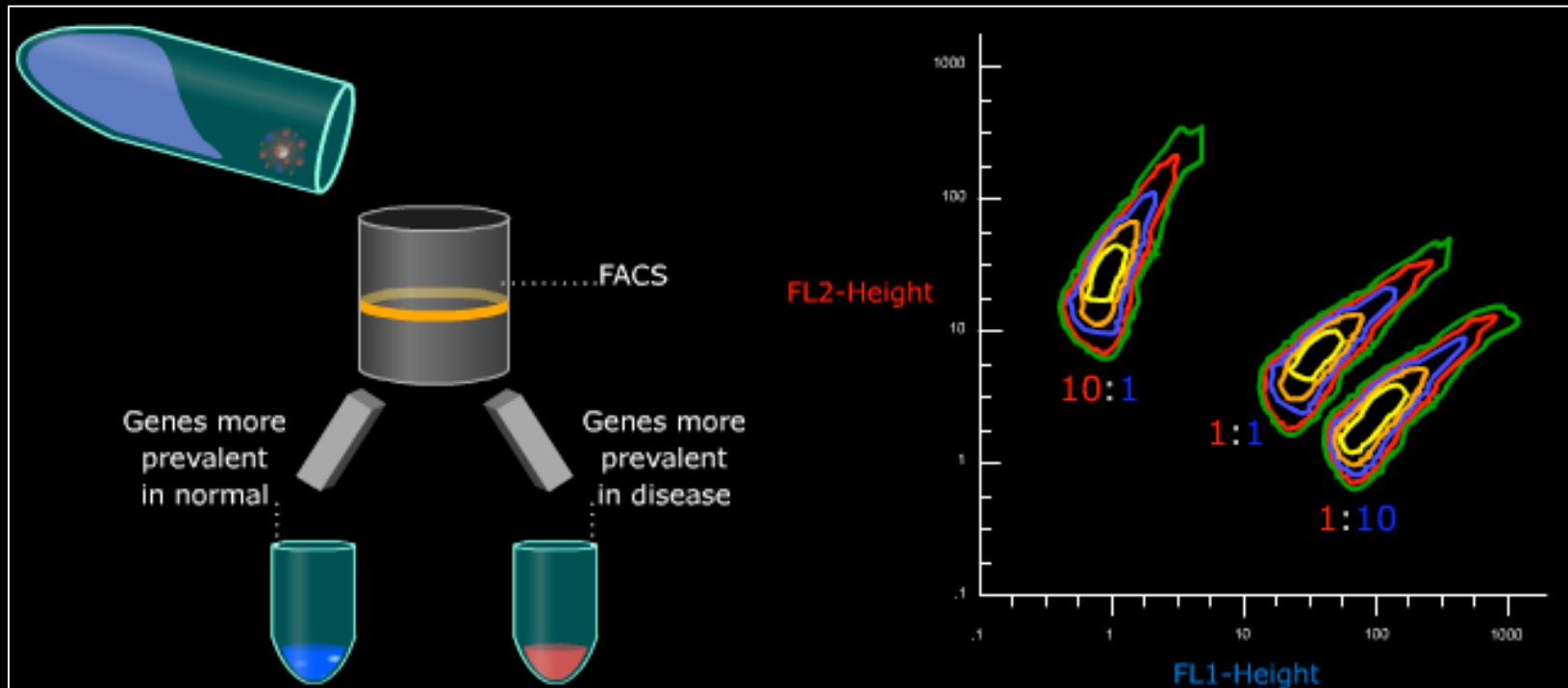
Sequence millions of these short 17 base tags to assess expression level

Opensystem : no a priori knowledge necessary



Lynx Megasort™ technology

Megasort technology permits the comparison of two DNA samples and the physical extraction of those DNA molecules that are present in the samples in different proportions.



The ratio of probes hybridizing to each microbead can be readily measured at high throughput using a fluorescence activated cell sorter (FACS). Microbeads labeled with more of one dye than the other can be easily identified and physically isolated.

Through FACS analysis, microbeads may be identified that carry more of one probe than the other (for example, more blue than red). Such microbeads correspond to genes expressed at a higher level in the 'blue' sample. These microbeads can be collected and their attached cDNAs analysed by conventional sequencing.