



HAL
open science

Réversion tumorale : étude fonctionnelle de TSAP6 et TCTP.

Alexandra Lespagnol

► **To cite this version:**

Alexandra Lespagnol. Réversion tumorale : étude fonctionnelle de TSAP6 et TCTP.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2008. Français. NNT : . tel-00294614

HAL Id: tel-00294614

<https://theses.hal.science/tel-00294614>

Submitted on 10 Jul 2008

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.

UNIVERSITE PARIS DIDEROT – PARIS 7
UFR BIOLOGIE ET SCIENCES DE LA NATURE

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 7
SPECIALITE : GENETIQUE HUMAINE

Par

Alexandra LESPAGNOL

**REVERSION TUMORALE
ETUDE FONCTIONNELLE DE TSAP6 ET TCTP**

Le mardi 15 avril 2008

Directeur de thèse : Pr. Daniel COHEN

Directeurs du laboratoire : Adam Telerman et Robert Amson

JURY

Pr. Marc FELLOUS	Hôpital Cochin, Paris	Président
Pr. Adam TELERMAN	ENS, Cachan	Co-Directeur de Thèse
Pr. François DAUTRY	Institut André Lwoff, Paris	Rapporteur
Pr. Bruno GOUD	Institut Curie, Paris	Rapporteur
Pr. Franck STURTZ	Université de Limoges	Examineur

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre.

Aristote (384 à 322 avant J.-C.)

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à Adam Telerman et Robert Amson sans qui rien n'aurait été possible. Vous m'avez fait confiance en me prenant dans votre équipe et vous m'avez permis et encouragé à faire cette thèse, je vous en remercie. Grâce à vous, j'ai travaillé sur un sujet très intéressant et novateur qu'est la réversion tumorale, j'ai énormément appris dans de nombreux domaines scientifiques. Je vous remercie également pour vos nombreux conseils. J'essaierai d'en faire bon usage. Ce projet n'a pas été simple à terminer et si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Un grand merci à vous.

Merci ensuite à Dominique Duflaut avec qui je partage ce travail, merci pour ton dynamisme, ta rigueur, ta franchise et ton esprit de synthèse. J'ai travaillé avec toi dans la bonne humeur et en toute confiance. J'ai énormément appris à tes côtés.

Je voudrais ensuite remercier Laurent Susini, tu m'as fait confiance au cours de ce parcours professionnel. Sans toi je n'en serai peut-être pas là. Merci pour tout.

Je voudrais remercier chaleureusement tous les membres du jury. Je remercie Daniel Cohen d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je remercie également François Dautry et Bruno Goud pour avoir acceptés d'être les rapporteurs et avoir eut la patience d'estimer ce manuscrit, merci également pour vos conseils. Je voudrais enfin remercier Marc Fellous le président du jury pour votre disponibilité ainsi que Franck Sturtz pour avoir accepté d'être présent le jour de ma soutenance.

J'ai commencé la biologie en 1996 dans le groupe de Recherche et Développement de la société Genset. J'ai travaillé pendant six années, sous la direction d'Ilya Chumakov au cours desquelles j'ai appris la biologie moléculaire. C'est pendant ces années que je me suis découvert une passion pour ce métier. J'aimerais remercier toute l'équipe pour votre aide et vos conseils et particulièrement Jean Luc Sambucy, Philippe Millasseau, Maryam Bastucci, Hadi Abderrahim, Myriam Nasroune, Gwenael Primas, Anne Puech et Laurent Cavarec pour m'avoir transmis votre passion pour la science. C'est grâce à vous que j'ai acquis mes méthodes de travail.

En 2001, j'ai rejoint l'équipe d'Adam Telerman et de Robert Amson avec lesquels j'ai travaillé sur la réversion tumorale pendant 5 ans. Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé et contribué à l'avancé de ce projet et avec qui j'ai travaillé durant cette période et plus particulièrement Guisy Fiucci, Pamela Stumptner, Stéphanie Besse, Marcel Tuynder, Sylvie Prieur et Brent Passer.

Je voudrais aussi remercier tous les scientifiques que j'ai rencontré lors des nombreuses collaborations. Votre aide a permis l'avancé de ces travaux. Merci à Pierre Chambon et son équipe, Clotilde Théry, Bruno Goud, Marc Mirande, Dino Moras. Je voudrais remercier plus particulièrement Michel Vidal, Jean-Christophe Marine, Jean-Claude Martinou, Lionel Blanc et Chantal Beekman, qui ont permis que ce projet arrive à terme. Merci également à Marie-Claude Guillemin, Meriem Garfa et Alain Schmitt pour votre aide précieuse.

Je voudrais remercier Christian Auclair pour m'avoir donné les moyens de terminer ce projet. Je voudrais également remercier Anita Bentley-Lewit et Barbara Dubanchet pour m'avoir accueillie si chaleureusement.

Je tiens aussi à remercier Stéphanie et Dominique, nous avons traversé des bons moments et des moments un peu plus difficiles, mais on a su se serrer les coudes pour affronter tout cela. Je vous remercie également pour ces moments de détente à la piscine, ça m'a fait un bien fou. J'espère qu'on pourra recommencer.

Je tiens également à remercier Agnès, mon amie, ma confidente et ex-voisine de quartier. Je te remercie pour ta joie de vivre et pour ton soutien quand j'ai eu des coups durs. Je garderai aussi en mémoire ces petits-déjeuners du samedi.

Merci aussi à Aline, Valérie, Arnaud, Alexandre et Frédéric, nous n'avons pas travaillé directement ensemble, mais j'ai partagé avec vous de bons moments pendant ces années. Merci également à Pascale pour ces longues journées de révision pour préparer les examens du CNAM. C'est peut-être grâce à ton aide que tout a pu commencer.

Je souhaiterais remercier particulièrement tous les gens avec qui j'ai travaillé et qui ont partagé avec moi tous ces moments. Merci pour votre enthousiasme dans les moments heureux et votre soutien dans les moments plus difficiles et aussi merci de m'avoir supportée. Vous êtes devenus pour moi plus que des collègues de travail et j'espère conserver cette amitié très longtemps.

Je remercie également toute ma famille. Vous avez sûrement transmis votre goût du travail bien fait, c'est pas toujours facile à gérer mais je fais de mon mieux. Merci à mes deux sœurs Emilie et Alexandra ainsi qu'à Mickael pour votre soutien et vos encouragements.

Je voudrais enfin remercier mon ami Dominique. Merci pour ton soutien, ton optimisme, tes sacrifices et tes encouragements. Merci également pour ta patience, ces années n'ont pas toutes été roses.

Vous avez tous participé à votre manière, sur le plan scientifique ou personnel à l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous !!!

Sommaire

<i>Résumé</i>	7
<i>Summary</i>	8
<i>Table des illustrations</i>	9
<i>Abréviations</i>	11
<i>Bref historique du cancer</i>	14
Objectifs de la thèse	16
1 - INTRODUCTION GENERALE	17
<i>La prolifération cellulaire</i>	17
Les régulateurs du cycle cellulaire	18
La régulation du cycle cellulaire	20
<i>La mort cellulaire programmée</i>	24
Les protéines qui régulent l'apoptose	25
Les mécanismes généraux de l'apoptose	27
2 - LA TRANSFORMATION CELLULAIRE	31
<i>L'instabilité génétique</i>	31
<i>Les proto-oncogènes</i>	32
<i>Les gènes suppresseurs de tumeurs</i>	34
La protéine P53	34
<i>Les facteurs épigénétiques</i>	37
<i>La suppression du phénotype malin par complémentation</i>	39
3 - LA REVERSION TUMORALE	42
<i>Le Parvovirus-H1 comme agent de sélection</i>	43
<i>Des modèles à partir de lignées cellulaires tumorales</i>	44
4 - GENES IMPLIQUES DANS LA REVERSION TUMORALE	46
<i>TSAP6</i>	50
Caractérisation structurale et cellulaire des STEAPs	50
Homologie structurale des STEAPs avec d'autres protéines	53
Conservation des Histidines (H)	56
Les STEAPs : des métalloreductase ?	58
Les protéines de la famille STEAP	58
La protéine TSAP6 ou STEAP3 ou pHyde ou Dudulin-2	60
<i>TCTP</i>	72
Caractérisation du gène tpt1	72
Caractérisation de la protéine TCTP	73
Régulation de TCTP	77
Fonction intracellulaire de TCTP	78
Fonction extracellulaire de TCTP	82
TCTP dans les modèles animaux	83
TCTP nouvelle cible contre le cancer	84

5 - APPROCHE EXPERIMENTALE	87
<i>Les souris transgéniques</i>	88
Knockout et knock-in de gène	89
Conditional Knockout de gène	89
<i>Les différentes étapes pour générer des souris transgéniques</i>	90
Formation des cellules ES	90
Formation des souris chimères	91
Génération de la lignée	91
Les cKO	92
6 - RESULTATS	93
<i>ARTICLE 1.</i>	97
<i>Exosome secretion, including the DNA-damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice</i>	
<i>ARTICLE 2.</i>	108
<i>TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.</i>	
<i>RESULTATS PRELIMINAIRES.</i>	115
<i>Mécanisme d'action de la Sertraline et de la Thioridazine.</i>	
7 - DISCUSSION	118
<i>Références bibliographiques</i>	
Articles	124
Ouvrages	149
Bibliographie personnelle	150
<i>Annexes</i>	
Annexe 1	151
Les gènes différenciellement régulés lors de la réversion tumorale	
Annexe 2	152
Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: Identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter.	
Annexe 3	155
The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase.	
Annexe 4	159
Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene.	
Annexe 5	160
Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion	

Résumé

Réversion tumorale : étude fonctionnelle de TSAP6 et TCTP.

Mon travail de doctorat a consisté en l'étude de deux gènes, TSAP6 et TCTP, qui sont régulés de manière différentielle dans la réversion tumorale. Les protéines encodées par ces deux gènes interagissent et forment un complexe tant *in vitro* que *in vivo*. Mon objectif était de mieux comprendre la fonction biologique de ces deux gènes. Différentes approches ont été employées, notamment la cristallographie (TCTP), souris knockout (TSAP6 et TCTP) et études par mutagenèse dirigée (TSAP6 et TCTP).

Les souris knockout pour le gène *tsap6* présentent une anémie microcytaire. Nous démontrons que cette anémie est due à un retard de maturation des réticulocytes ainsi qu'à une sécrétion défectueuse du récepteur à la Transferrine par les exosomes. Étant donné que le gène TSAP6 est une cible transcriptionnelle directe de la p53, nous avons voulu analyser la sécrétion des exosomes suite à une stimulation de p53 (par rayon X ou Actinomycine D). Nous montrons qu'en l'absence de TSAP6, on ne parvient pas à stimuler une sécrétion des exosomes. De manière plus générale ces expériences ont démontré que le gène TSAP6 avait *in vivo* un rôle prédominant dans la sécrétion des exosomes, y compris suite à l'activation de la p53.

Nous avons surtout étudié le rôle que joue TCTP dans l'apoptose. La délétion du gène *tctp* dans les souris knockout est létale en provoquant une augmentation de l'apoptose au cours de l'embryogenèse. Cette mort embryonnaire se produit entre les 6,5^{ème} et 9,5^{ème} jours du développement. La détermination de la structure de la protéine TCTP par cristallographie avec une résolution de 2Å montre que la protéine humaine est très homologue à celle de *s.pombe*. De plus, nous avons observé suite à une analyse informatique une homologie de structure entre les hélices H2 et H3 de TCTP et les hélices H5 et H6 de BAX, une protéine pro-apoptotique impliquée dans la perméabilité de la membrane mitochondriale. On a démontré que grâce à ces deux hélices, TCTP effectue son action anti-apoptotique et inhibe la dimérisation de BAX à la membrane des mitochondries, empêchant ainsi l'apoptose.

Nous montrons également que la Sertraline et la Thioridazine, qui induisent la mort des cellules tumorales et une baisse concomitante de TCTP, se lient directement à TCTP et empêchent ainsi la formation du complexe TSAP6-TCTP.

Mots-clefs : TCTP/tpt1, TSAP6/Steap3, réversion tumorale, apoptose, cancer, exosomes, knockout, structure, récepteur à la Transferrine, BAX.

Summary

Tumor reversion: functional analysis of TSAP6 and TCTP.

During my PhD I studied two genes, TSAP6 and TCTP that are differentially regulated in tumor reversion. The proteins encoded by these two genes interact and form a complex both *in vitro* and *in vivo*. My goal was to better understand the biological function of these two genes. Different approaches were used, namely crystallography (TCTP), knockout mice (TSAP6 and TCTP) and site-directed mutagenesis (TSAP6 and TCTP).

The TSAP6 knockout mice display a microcytic anemia. We have shown that this anemia is due to a delay in the maturation of the reticulocytes and a default in the secretion of the Transferrin-Receptor by the exosomes. Since TSAP6 is a direct transcriptional target gene of p53, we analyzed the secretion of exosomes following activation of p53 by irradiation or Actinomycin D. We demonstrate that in the absence of TSAP6, there is no induction in the secretion of exosomes. More generally, we show that the TSAP6 gene has a major role *in vivo* in the secretion of exosomes, including following activation of p53.

We studied the TCTP gene in its antiapoptotic role. The deletion of TCTP in knockout mice is lethal. This loss of TCTP causes an increase of apoptosis during embryogenesis. This embryonic lethality occurs between days 6,5 and 9,5 of the development.

The crystal structure of TCTP at 2Å resolution shows a strong homology with the one of *S.pombe* protein. Furthermore, we observed a homology between the H2-H3 helices of TCTP and the H5-H6 helices of BAX, a proapoptotic protein involved in mitochondrial membrane permeability. We demonstrated that these two helices are responsible for the antiapoptotic function of TCTP, which inhibits the dimerization of BAX in the mitochondrial membrane, preventing this way cell death.

We also show that Sertraline and Thioridazine, that kill tumor cells by decreasing the level of intracellular TCTP, bind directly to TCTP and prevent the formation of a complex between TSAP6 and TCTP.

Keywords: TCTP/tpt1, TSAP6/Steap3, tumor reversion, apoptosis, cancer, exosomes, knockout, structure, Transferrin receptor, BAX.

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie et de ces pathologies.	17
Figure 2 : Contrôle du cycle cellulaire.	18
Figure 3 : Régulation de l'activation des complexes CYCLINE/CDK.	19
Figure 4 : Contrôle de la transition G1->S.	22
Figure 5 : Contrôle de la transition G2->M.	23
Figure 6 : Représentation schématique des voies de l'apoptose dans la cellule.	28
Figure 7 : Activation et régulation de la protéine P53.	36
Figure 8 : Caractérisation des clones transfectés par la protéine P53 thermosensible.	40
Figure 9 : Représentation schématique des TSAP et des TSIP dans le système M1/LTR6.	40
Figure 10 : la protéine P53 régule directement la transcription des gènes <i>siah1b</i> et <i>tsap6</i> .	41
Figure 11 : Isolation de cellules révertantes.	43
Figure 12 : Caractérisation des clones révertants.	44
Figure 13 : Classification des gènes régulés lors du processus de la réversion tumorale.	46
Figure 14 : Identification et régulation de TSAP6 dans les différents modèles	47
Figure 15 : TSAP6 est une protéine pro-apoptotique.	47
Figure 16 : Identification et régulation de TCTP dans les différents modèles.	48
Figure 17 : Caractérisation de TCTP une protéine anti-apoptotique.	49
Figure 18 : Alignements et domaines TMs des protéines de la famille STEAP.	50
Figure 19 : Prédiction de motifs sur les protéines de la famille STEAP.	51
Figure 20 : Représentation schématique de la structures des protéines STEAP, YED-Z, NOX et FRE.	53
Figure 21 : Conservation du motif Rossmann fold.	54
Figure 22 : Réaction d'oxydoréduction suite à l'activation de la protéine NOX-2.	55
Figure 23 : Alignement des domaines TMs 3, 4 et 5.	57
Figure 24 : Modèle structural de la liaison des molécules d'hèmes sur la protéine GP91 ^{phox} .	57
Figure 25 : Conservation des protéines TSAP6 au cours de l'évolution.	61
Figure 26 : Rôle de TSAP6 dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle en G2.	63
Figure 27 : La voie de sécrétion classique.	64
Figure 28 : Quelques voies de sécrétion non classique.	65
Figure 29 : Formation et sécrétion des exosomes.	67
Figure 30 : Composition protéique des exosomes.	68
Figure 31 : Récapitulatif sur les connaissances de TSAP6.	71
Figure 32 : Alignements des séquences de la protéine TCTP de 22 espèces différentes.	74
Figure 33 : Structure secondaire et localisation des domaines liés aux fonctions de TCTP.	75
Figure 34 : Représentation schématique de la structure 3D de TCTP.	76
Figure 35 : Les différentes modifications post-traductionnelles prédites ou identifiées.	77
Figure 36 : Hypothèse sur le rôle de TCTP dans la voie de signalisation InR/TSC.	80
Figure 37 : Bilan des différents sites de liaison au calcium identifiés dans la littérature.	81
Figure 38 : Effet des drogues sur les cellules cancéreuses et sur l'expression de TCTP.	85
Figure 39 : Récapitulatif sur les connaissances de TCTP.	86
Figure 40 : Principe de la réaction catalysée par la recombinaise Cre.	89
Figure 41 : Les principaux types de vecteurs de recombinaison homologue.	90
Figure 42 : Elimination de la cassette de résistance Neo ^R .	92
Figure 43 : Génération de souris KO vs cKO.	93
Figure 44 : Structure du gène TSAP6 et construction pour générer les cKO.	94
Figure 45 : Présence de pseudogènes pour <i>tpt1</i> dans le génome de la souris.	95
Figure 46 : Structure du gène TCTP et construction pour la génération des cKO.	95
Figure 47 : caractérisation de la protéine murine TSAP6 par Western-Blot.	97
Figure 48 : localisation cellulaire de TSAP6.	98
Figure 49 : Phénotype des souris KO pour le gène TSAP6.	99
Figure 50 : Distribution du fer dans l'organisme.	101
Figure 51 : Expression de TF-R au cours de la maturation des réticulocytes.	102
Figure 52 : Expression et sécrétion de TF-R.	103
Figure 53 : La délétion de TSAP6 crée une déficience dans le processus de l'apoptose.	105
Figure 54 : Analyse de la production d'exosomes après γ -irradiation ou Actinomycine D.	106
Figure 55 : Liaison de TCTP avec les drogues Sertraline et Thioridazine.	115
Figure 56 : Effet des drogues Sertraline et Thioridazine sur la sécrétion de TCTP.	116

Figure 57 : Les drogues Sertraline et Thioridazine inhibent l'interaction TCTP-TSAP6.

116

Abréviations

ACRATA	Apoptosis, Cancer and Redox Associated TrAnsmembrane
ActD	Actinomycine D
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALIX	ALG-2 Interacting protein X
APAF-1	Apoptosis Protease Activating Factor-1
ARF	Alternative Reading Frame
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia-Telangiectasia Related
BAD	BCL-2 Antagonist of cell Death
BAK	BCL-2 Antagonist/Killer
BAX	BCL-2-Associated protein X
BCL-2	B-Cell Lymphoma 2
BCL-xL	B-Cell Leukemia xL
BCR	Récepteur à l'antigène des lymphocytes B
Bcr-Abl	Breakpoint Cluster Region-Abl
BFA	Bréfeldine-A
BH	BCL-Homology Domain
BID	BCL-2 Interacting domain Death agonist
BIM	BCL-2 Interacting Mediator of cell death
BMDC	Bone Marrow Dendritic Cell
BNIP3	BCL-2 :E1B 19 kDa-Interacting Protein 3
C-ABL	ABelson murine Leukemia viral oncogene homolog 1
CAK	CDK Activating Kinase
CASPASEs	Cysteine ASPartate- specific proteASEs
CDC25	Cell Division Cycle 25
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CHK1	CHecKpoint1
Chr.	Chromosome
CKI	Cyclin Kinase Inhibitor
cKO	Conditional knockout
CYT-C	Cytochrome-C
DHT	DiHydroTestosterone
DIABLO	Direct IAP Binding Caspases
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DR	Death Receptor
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Receptor
ENDO-G	Endonucléase G
ENU	Ethyl-Nitro-Urée
ES	Embryonic Cells
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRE	Ferric REductase
FudR	FIUorouridine-DesoxyRibose
GADD45	Growth Arrest DNA-Damage 45
GDP	Guanosine Di-Phosphate

GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
Golgi	Appareil de Golgi
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HRF	Histamine Releasing Factor
HSC	Heat Shock protein Cognate
HSP	Heat Shock Protein
HTRA2	High Temperature Regulated protein A2
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IL	InterLeukine
INK4	Inhibitor of CDK-4
KO	Knockout
LTC	Lymphocyte T Cytotoxique
LTH	Lymphocyte T Helper
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia sequence 1
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEFs	Mouse Embryo Fibroblasts
MFG-E8	Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNAs
MMI-1	Microtubule and Mitochondria Interacting Protein-1
Mo-MPT	Molybdenum Molybdopterin
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
MSS4	Mammalian Suppressor of Sec4
MVB	Multi-Vesicular-Bodies
MULE	MCL-1 Ubiquitin Ligase E3
MYC	v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYT1	Membrane associated Tyrosine/threonine 1
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEU	NEURO/glioblastoma derived oncogene homolog
NF-κB	Nuclear Factor B
NIX	Nip3-like protein X
NOX	NADPH oxidase
NOXA	Noxious
PARP	Poly ADP-ribose Polymerase
PCA-3	Prostate Cancer Antigen-3
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PKR	Protein Kinase RNA activated
PLK-1	Polo-Like Kinase-1
PM	Plasma Membrane
PMN	PolyMorphoNuclear leukocytes
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTP	Permeability Transition Pore
PUMA	P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

RAS	Rat Sarcoma virus oncogene
RB	RetinoBlastome
RE	Reticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SV40	Sarcoma Virus 40
SCF	SKP1-Cullin-F-box
SF1	Splicing Factor 1
SIAH	Seven In Absentia Homologue
SMAC	Second Mitochondrial Activator of Caspase
SMAD	Sma- and MAD-related protein 1
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog
STAMP	Six TrAnsMembrane protein of Prostate
STEAP	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate
t-BID	Truncated-BID
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
TF	Transferin
TF-R	Transferin-Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TGN	Trans Golgi Network
TIARP	Tumor necrosis factor-alpha-Induced Adipose-Related Protein
TM	TransMembranaire
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor-Receptor
TPT1	Tumor Protein, Translationally-controlled 1
TRADD	TNF-Receptor Associated Death Domain
TRAF2	TNF Receptor Associated Factor 2
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R	TRAIL-Receptor
TRAMP	TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate
TSAP	Tumor Suppressor Activated Pathway
TSG101	Tumor Susceptibility Gene product 101
TSIP	Tumor Suppressor Inhibited Pathway
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP Nick End Labeling
WAF1	Wild Type p53-Activated Fragment 1
WT	WildType
XAF-1	XIAP Associated Factor-1
XIAP	X-linked IAP

Bref historique du cancer

Le cancer existe depuis toujours et malgré les nombreux progrès qui ont été faits dans la compréhension du développement et le traitement de cette maladie, il n'en reste pas moins que c'est une maladie grave qui touche toutes les classes d'âges de la population. Selon l'American Cancer Society, chaque année, onze millions de nouveaux cas sont diagnostiqués dans le monde et plus de sept millions de personnes en meurent. En France, le cancer est devenu la première cause de décès selon le Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut de veille sanitaire (INSV) publié en septembre 2007 devant les maladies cardiovasculaires. Selon les estimations de l'OMS, en 2006 il y avait 3,2 millions de nouveaux cas de cancer par rapport à 2,9 millions en 2004 et 1,7 million de décès liés au cancer dans toute l'Europe (Ferlay et al., 2007). Selon les mêmes sources, le nombre de décès dans le monde liés aux cancers devrait atteindre neuf millions en 2015 et plus de onze millions en 2030.

Ce sont sur des fragments de squelettes humains datant de la préhistoire que l'on trouve les traces les plus anciennes du cancer. En 2200 avant J.-C., les médecins égyptiens décrivent avec précision le cancer du col de l'utérus sur des papyrus chirurgicaux, ces textes sont certainement les plus anciens textes connus à ce jour. 2000 ans avant notre ère, les anciens hindous essayèrent de détruire les cancers en y appliquant des cataplasmes de pâte corrosive contenant de l'arsenic.

Les Asclépiades, médecins grecs dont faisait partie Hippocrate (460-370 avant J.-C.) donnèrent son nom à cette maladie. Le mot «cancer» vient du grec «karkinos» qui signifie «crabe» ou «pince» et d'où dérive «carcinome» (autre dénomination du cancer). Le nom vient de l'aspect de sa propagation, ressemblant à des pattes de crabe. Hippocrate en a fait une description précise : une tumeur envahissante, dure, non-inflammatoire avec une tendance à la récurrence et à la généralisation, conduisant à une mort inéluctable.

Comme pour expliquer la plupart des autres maladies, Hippocrate s'appuyait sur la «théorie des humeurs», théorie qui prévaudra jusqu'au milieu du XVII^e siècle pour expliquer les cancers. Selon lui les cancers étaient la conséquence d'un déséquilibre entre les quatre substances de l'organisme : la lymphe, le sang, la bile jaune produite par le foie et la bile noire, supposée produite par la rate, cette dernière était selon lui responsable des cancers. L'excès de bile noire entraînait le grossissement, l'induration, la coloration plutôt foncée et *in fine* l'ulcération et la nécrose. Hippocrate affirma que le cancer était incurable. Le traitement consistait, à l'époque, à rétablir l'équilibre par des purges et des saignées effectuées au plus près de la tumeur.

Aulus Cornelius Celsus (28 avant J.-C. - 50 après J.-C.) médecin romain influencé par la médecine grecque et égyptienne décrit les différents degrés dans l'évolution de la maladie : le premier degré appelé "cacoethes" en grec (tumeurs de stade précoce), suivi par un carcinome sans ulcération (lésions pré-malignes et malignes de type superficielles) et ensuite le carcinome ulcéré (ulcères d'allure maligne avec pénétration profonde). Aulus Cornelius Celsus introduira le concept de propagation à distance de la tumeur en constatant la réaction ganglionnaire lymphatique satellitaire. Il pensait que seuls les "cacoethes" pouvaient être traités par excision et déconseillait de traiter les lésions plus avancées.

Galien (130-201 après J.-C.) utilisa le terme grec "oncos" pour désigner une grosseur ou une tumeur d'allure maligne. Leonides (180 après J.-C.) fut le premier à décrire des mastectomies, avec un scalpel, en découpant autour du mamelon dans le tissu encore sain; la plaie était ensuite cautérisée pour éviter l'hémorragie et tuer les tissus cancéreux résiduels. Il déconseillait la mastectomie pour des lésions avancées.

Tout au long du moyen âge, les chirurgiens restèrent divisés et sceptiques au sujet de l'intervention chirurgicale.

Au XVII^e siècle, Gaspard Aselli (1581-1625) découvrit le système lymphatique. Descartes (1596-1650) découvrit que c'était la lymphe et non la bile noire qui était responsable de la formation des tumeurs. Henri François le Dran (1685-1770) comprit que le cancer débutait localement et s'étendait ensuite par les canaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques.

À cette époque, la population croyait que le cancer était contagieux.

À partir du XVIII^e siècle, l'idée que le cancer était une maladie locale se profila et John Hunter (1728-1793) fut le premier à évoquer des prédispositions au cancer comme l'hérédité, l'âge et peut-être le climat. Il estima l'âge moyen d'avoir un cancer, entre 40 et 60 ans et constata qu'un cancer du sein, chez une femme de moins de 40 ans, était très rapidement fatal.

Au début du XIX^e siècle, Xavier Bichat (1771-1802) puis Laennec (1781-1826) sont à l'origine de la théorie cellulaire moderne du cancer. Xavier Bichat arriva à comprendre que les diverses localisations d'un cancer ne seraient qu'une seule et même maladie, touchant le même tissu mais dans différents organes. Rudolph Virchow (1821-1902) affirma en 1853 que toute cellule vient d'une autre cellule et qu'un cancer vient de la prolifération d'une cellule initiale, dérivant elle-même d'une cellule normale, ce qui implique de supprimer toutes les cellules cancéreuses de l'organisme pour permettre la guérison.

À partir de 1912 et encore aujourd'hui, on oriente les recherches sur la cellule. Les mécanismes de la formation des cancers se clarifient. Suite à une exposition à des agents extérieurs physiques, chimiques ou biologiques comme les ultraviolets, les agents oxydants, ou les virus, ou par hérédité, la cellule normale se transforme en une cellule cancéreuse. Par un long processus, la cellule cancéreuse se développe de manière incontrôlée nuisant au bon fonctionnement du corps. Cette cellule cancéreuse est à l'origine de lésions qui peuvent se transformer en tumeurs malignes. A un stade avancé, les cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur maligne et être emportées, par le sang ou la lymphe, vers d'autres parties du corps, on parle alors de métastases.

Aujourd'hui, on commence à entrevoir la possibilité de maîtriser certains cancers grâce à un diagnostic plus précoce et à un traitement plus efficace. L'éventail des thérapies anticancéreuses se développe après la radiothérapie et la chimiothérapie, plus récemment c'est l'immunothérapie et la thérapie génique qui permettront sans doute de traiter le cancer de façon moins destructrice. L'identification de marqueurs biologiques spécifiques des cellules tumorales va également permettre des traitements plus spécifiques.

Objectifs de la thèse

Il a été montré que certaines cellules tumorales parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué, c'est ce que l'on appelle la réversion tumorale.

Le but de la recherche menée par Adam Telerman et Robert Amson est de comprendre les voies moléculaires mise en œuvre dans la réversion tumorale et de développer à partir de ces connaissances de nouvelles thérapies contre le cancer.

Le phénomène de la réversion tumorale étant assez rare (1 cellule sur 1 million), il a fallu mettre au point une technique afin d'isoler spécifiquement ces cellules dites révertantes et c'est en se basant sur les propriétés du Parvovirus-H1 qui tue préférentiellement les cellules tumorales tout en épargnant les cellules révertantes que les premiers modèles KS et US ont été isolés respectivement à partir des cellules cancéreuses K562 et U937 (Telerman et al., 1993) (Roperch et al., 1999).

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans le mécanisme de la réversion tumorale, des analyses différentielles d'expression de gènes dans ces modèles biologiques spécifiques ont été réalisées (Amson et al., 1996) (Tuynder et al., 2002). Ces analyses ont permis d'identifier deux groupes de gènes différentiellement exprimés. Les gènes *TSAP* (**T**umor **S**uppressor **A**ctivated **P**athway) qui sont plus transcrits dans les clones révertants qui ont perdu une partie de leurs propriétés tumorigènes comparés aux cellules parentales et les gènes *TSIP* (**T**umor **S**uppressor **I**nhibited **P**athway) qui sont eux moins transcrits dans les cellules révertantes.

Mon travail a consisté à étudier la fonction de deux ces gènes, un TSAP et un TSIP dans des modèles animaux et de mettre en évidence leur implication dans le processus de la réversion tumorale. Pour cela j'ai élaboré les constructions permettant la suppression des gènes par le système *cre/lox*. Celles-ci ont été injecté dans des cellules ES afin de générer des souris conditional knockout pour les gènes *tctp* et *tsap6*. Une étude de leur phénotype a ensuite été entreprise.

En parallèle de cette approche fonctionnelle, une approche pharmacologique a été mise en oeuvre. Puisqu'on savait que dans les clones révertants, ces gènes étaient différentiellement exprimés par rapport aux cellules parentales, il s'agissait de découvrir des drogues qui pouvaient induire cette différence d'expression et de simuler ainsi une réversion dans les cellules cancéreuses.

Ce fut un travail important et très intéressant qui a été effectué en collaboration avec l'ensemble des chercheurs du laboratoire et de nombreuses collaborations.

1 - INTRODUCTION GENERALE

Notre organisme est composé d'environ 10^{14} cellules réparties dans plus de deux cents types cellulaires différents pour composer les tissus. La prolifération cellulaire au sein de ces tissus est rigoureusement contrôlée, au cours des processus physiologiques comme le développement embryonnaire, la régénération des tissus et le vieillissement. La durée de vie d'une cellule est très variable, certaines cellules ne nécessitent pas un renouvellement constant comme les neurones ou les cellules cardiaques alors que d'autres sont perpétuellement en cours de multiplication comme les cellules du sang et les cellules intestinales. À l'âge adulte, le nombre de cellules dans l'organisme est constant, il y a un équilibre entre plusieurs phénomènes : la division cellulaire, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire. C'est ce qu'on appelle l'homéostasie cellulaire. C'est le mécanisme permettant de contrôler l'équilibre des structures tissulaires en régulant le nombre de cellules vivantes et fonctionnelles par rapport au nombre de cellules entrain de mourir afin que chaque tissu et chaque organe reste opérationnel à chaque instant.

Tout déséquilibre de cette homéostasie cellulaire, que se soit une hyper-prolifération cellulaire ou une hypo-prolifération peut conduire respectivement à des pathologies comme le cancer, les maladies auto-immunes, les maladies dégénératives et des destructions tissulaires (**Fig. 1**).

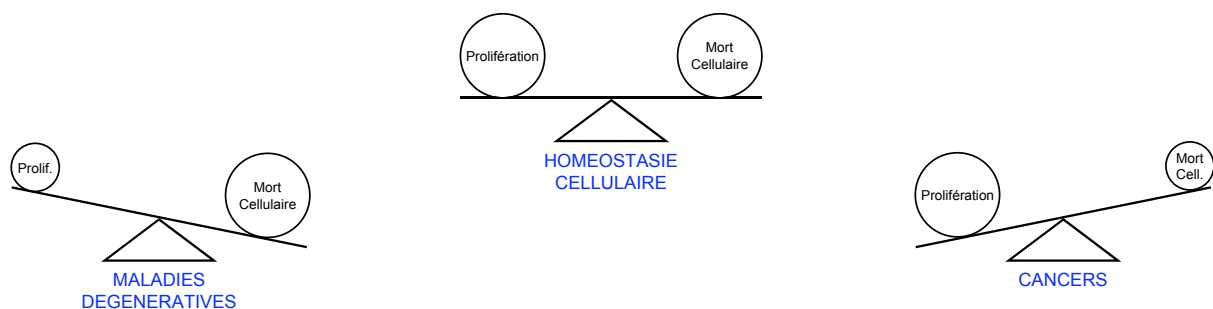


Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie et de ces pathologies.

Un déséquilibre dans le maintien de l'homéostasie est à l'origine de différentes pathologies.

Cette homéostasie cellulaire résulte d'un équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée ou l'apoptose. Cet équilibre est maintenu grâce à la régulation de l'expression d'un ensemble de gènes, notamment les gènes qui contrôlent le cycle cellulaire ainsi que ceux qui régulent l'apoptose et les gènes responsables du maintien de la cellule.

La prolifération cellulaire

« Là où une cellule apparaît, il doit en exister une plus ancienne, tout comme les animaux ne se forment qu'à partir d'animaux et les végétaux qu'à partir de végétaux. »

Rudolf Virchow 1858

Les cellules sont engendrées à partir de cellules et la seule manière de former deux cellules c'est d'en diviser une. Tous les organismes vivants sont formés par une succession de division

cellulaire. Pour que les cellules qui prolifèrent gardent une taille relativement constante lors de leur division, la longueur du cycle cellulaire doit correspondre au temps que met la cellule pour doubler de taille. La longueur du cycle cellulaire va donc dépendre des nutriments et des facteurs de croissance dans l'environnement de la cellule. Mais quel que soit le temps que met une cellule pour se diviser, les phases du cycle cellulaire sont toujours les mêmes (**Fig. 2**).

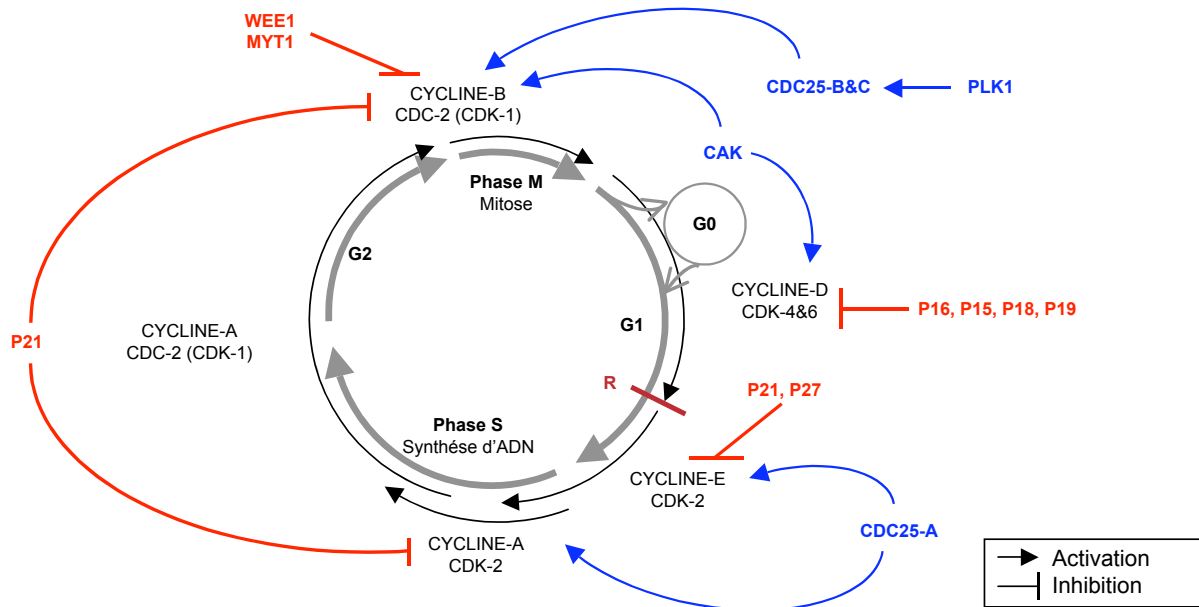


Figure 2 : Contrôle du cycle cellulaire.

Les transitions entre chaque phase du cycle cellulaire sont régulées par les différents complexes CYCLINE/CDK. La plupart de ces complexes sont eux-mêmes activés (en bleu) ou inhibés (en rouge) par un ensemble de gènes.

Les principales phases du cycle cellulaire sont les phases S et M. Pendant la phase S (Synthèse), la cellule synthétise son ADN en vue d'une division cellulaire qui aura lieu pendant la phase M (Mitose). Ces deux phases sont séparées par des phases intermédiaires G (Gaps) appelées G1 avant la phase S et G2 avant la phase M (**Fig. 2**). Les trois premières phases G1, S et G2 constituent l'interphase entre deux mitoses. Durant la phase G1, la cellule effectue sa croissance, elle intègre les signaux mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S. Pendant la phase G2, la cellule se prépare à rentrer en mitose pour accomplir sa division. Les cellules qui ne se divisent pas sont dans une phase intermédiaire G0, la plupart des cellules chez un adulte sont dans cette phase.

Le cycle cellulaire est régulé par un système de contrôle dont le but est de vérifier l'intégrité de la transmission de l'ADN de la cellule mère vers les deux cellules filles. Un des points de contrôle important dans cette régulation, c'est le point de restriction (R) au cours de la phase G1 découvert en 1974 par le groupe de A.B. Pardee. Avant ce point de restriction, la cellule est sous le contrôle de signaux extracellulaires, elle regroupe et fabrique tout ce dont elle a besoin pour générer deux cellules filles. Après ce point, elle prolifère indépendamment des signaux extracellulaires et met tout en œuvre pour se diviser (Zetterberg et al., 1995) (**Fig. 2**).

Les régulateurs du cycle cellulaire

Il y a donc deux catégories de gènes qui vont réguler le cycle cellulaire, les activateurs qui vont stimuler la prolifération cellulaire et les répresseurs qui vont ralentir ou bloquer les

transitions. Ces deux catégories de gènes assurent ensemble le bon déroulement du cycle cellulaire et participent au maintien de l'homéostasie.

Les activateurs

Cette catégorie regroupe diverses protéines comme les CYCLINES et les CDKs (Cyclin **D**ependant **K**inase) qui forment ensemble des complexes qui jouent un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire (Murray et al., 2004). Les complexes CYCLINE/CDK sont composés de deux sous-unités. Une kinase, la sous-unité catalytique appelée CDK qui a besoin pour être active d'une sous-unité régulatrice portant le nom de CYCLINE parce que son niveau oscille au cours du cycle cellulaire. Chaque phase du cycle est sous le contrôle d'un complexe CYCLINE/CDK spécifique (**Fig. 2**). Les CYCLINES n'ont pas d'activité enzymatique, ce ne sont que des protéines régulatrices des CDKs, elles sont transcrites brusquement à des phases précises du cycle et dégradées rapidement par le protéasome suite à leur ubiquitination par les complexes protéiques SCFs (SKP1-Cullin-F-box). Le niveau de la CYCLINE doit dépasser un certain seuil pour que la CDK soit activée. Les CDKs sont des Sérine-Thréonine kinases, des enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles jouant un rôle dans la progression dans le cycle cellulaire ou dans des événements plus spécifiques du cycle cellulaire comme la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, la compaction des chromosomes ou la réplication de l'ADN. Les CDKs transfèrent le groupement Phosphate de l'ATP (**A**denosine **T**ri-**P**hosphate) sur une Sérine ou une Thréonine d'une protéine cible. La phosphorylation de ces protéines cibles entraîne un changement de conformation et une activation ou au contraire une inhibition. À la différence des CYCLINES, les CDKs sont présentes à tout moment du cycle. La formation du complexe CYCLINE/CDK est indispensable à leur activation mais pas seulement. Un ensemble de phosphorylations et de déphosphorylations sont également nécessaires à cette activation (**Fig. 3**).

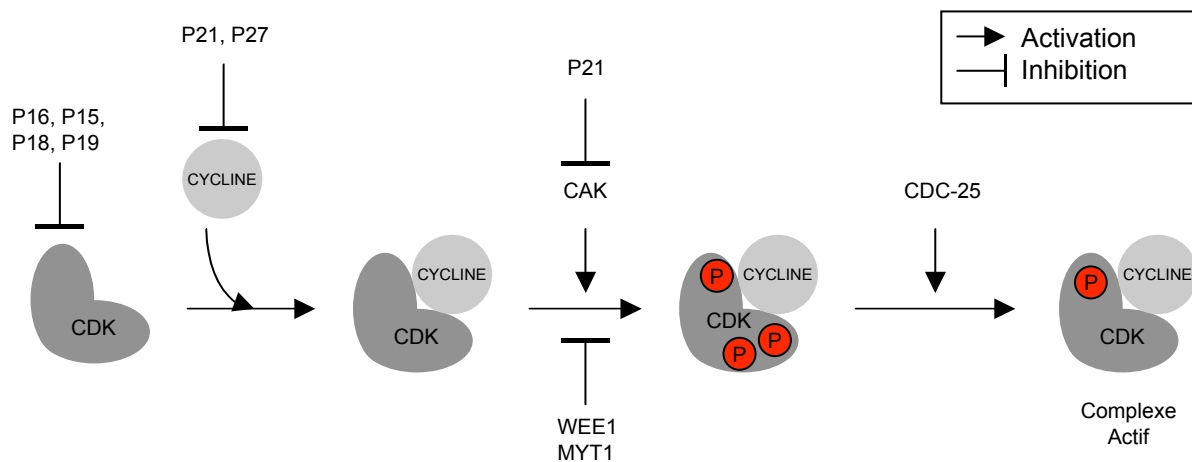


Figure 3 : Régulation de l'activation des complexes CYCLINE/CDK.

L'activation du complexe CYCLINE/CDK est régulée par un ensemble de protéines activatrices (les kinases CAKs, les phosphatases CDC-25s) et de protéines inhibitrices (les CKIs : P16, P15, P18, P19, P21, P27 et les kinases WEE1 et MYT1).

La protéine CDK-7 avec la CYCLINE-H et le facteur MAT-1 forment le complexe CAK (CDK **A**ctivating **K**inase) qui régule le cycle cellulaire en phosphorylant directement le résidu Thréonine 161 des kinases CDK-1, CDK-2, CDK-4 et CDK-6 (Lolli et al., 2005).

Au cours de la transition G2->M, la kinase PLK-1 (**P**olo-**L**ike **K**inase-1) activerait les CDKs via la phosphorylation des protéines CDC25-B et C (Myer et al., 2005) (**Fig. 3**).

Les phosphatases CDC25s (Cell Division Cycle 25) activent les CDKs en déphosphorylant les résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15. Chez l'homme, la famille des phosphatases CDC25s regroupe trois membres qui pour certains auteurs sont spécialisés chacun dans différentes transitions du cycle ou qui coopèrent ensemble pour réguler la progression du cycle cellulaire (Boutros et al., 2006) (**Fig. 3**). Les CDC25s sont reportés pour être surexprimés dans de nombreux cancers faisant de ces phosphatases de nouvelles cibles dans les thérapies anti-cancéreuses.

Les répresseurs

Les complexes CYCLINE/CDK ainsi que les kinases et les phosphatases sont sous le contrôle d'un autre type de protéines. Celles-ci ont pour rôle de ralentir le processus de la division cellulaire en cas d'anomalie ou de signaux anti-mitogènes.

Les kinases WEE1 et MYT1 (Membrane associated Tyrosine/Threonine 1) bloquent la transition G2->M. Elles inactivent les CDKs par phosphorylation des résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14 (Mueller et al., 1995) (**Fig. 3**).

Les CKIs (Cyclin Kinase Inhibitor) contiennent une région C-terminal variable et une région N-terminal conservée indispensable à l'inhibition des complexes CYCLINE/CDK (Besson et al., 2008). Ils empêchent la progression du cycle cellulaire en réponse à des stimuli intra ou extracellulaires. Certains CKIs ($p15^{INK4B}/MTS2$, $p16^{INK4A}/MTS1$, $p18^{INK4C}$ et $p19^{INK4D}$) s'associent aux CDKs empêchant la formation du complexe avec la CYCLINE. Le locus INK4A/ARF (INhibitor of CDK-4/Alternative Reading Frame) code pour deux gènes inhibiteurs *p16* et *p14* qui bloquent le cycle cellulaire de deux manières différentes. Le gène $p16^{INK4A}$ code pour une protéine qui bloque la phosphorylation de la protéine RB (RétinoBlastome) et le gène *p14(ARF)* code pour une protéine qui dégrade MDM2 et stabilise P53. D'autres CKIs comme P21, P27 et P57 s'associent directement avec le complexe CYCLINE/CDK et inactivent la CDK. La protéine P21 joue un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire, elle peut également ralentir la prolifération en inactivant le complexe CAK (**Fig. 3**). Lorsque l'ADN est modifié ou fragmenté la surexpression de P21 par la protéine P53 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ou en G2.

Comme nous le verrons par la suite, la protéine RB joue également un rôle clé dans la transition G1->S. Hypophosphorylée pendant la phase G1 du cycle cellulaire, la protéine RB lie et inhibe E2F. Une fois phosphorylée par les CDKs au cours de la phase G1, elle se détache du facteur de transcription E2F qui est alors activé et peut transcrire différents gènes et permettre le passage des cellules en phase S (Giacinti and Giordano 2006). Toutes ces protéines activatrices et inhibitrices sont elles-mêmes contrôlées en amont par des signaux extracellulaires et intracellulaires.

La régulation du cycle cellulaire

La surveillance de l'intégrité de l'ADN s'effectue tout au long de l'interphase. Si l'ADN présente des lésions, le cycle s'arrête en G1 et la transition G1->S n'a pas lieu. Si la réplication ne s'effectue pas correctement, le cycle est arrêté en G2 et la transition G2->M n'a pas lieu. Dans les deux cas, le cycle est arrêté pour donner le temps à la cellule de réparer ou de terminer correctement la réplication. Les mécanismes de surveillance de l'intégrité de l'ADN font intervenir d'autres molécules comme certains membres de la famille des PI3KK (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinase) ou les kinases ATR (Ataxia-Telangiectasia Related) et ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) qui sont activées suite à des lésions de l'ADN. ATR est activée en réponse à des dommages causés par des UV et ATM est activée en réponse à une exposition à des radiations ionisantes. Ces protéines ATR et ATM vont

activer les kinases CHK (**CHeckpoint**) et/ou le facteur de transcription P53 par phosphorylation.

Transition G0->G1

Les cellules en G0 n'effectuent ni réplication d'ADN, ni mitose, leur cytoplasme ne contient pas de CYCLINES et le facteur de transcription E2F y est maintenu inactif par liaison avec la protéine RB. Ces cellules peuvent sortir de G0 pour entrer en G1 si elles sont stimulées par des signaux extracellulaires comme des mitogènes qui stimulent par exemple la division cellulaire en éliminant les contrôles négatifs intracellulaires, des facteurs de croissance qui stimulent la croissance cellulaire en favorisant la synthèse des protéines et en inhibant leur dégradation et les facteurs de survie qui favorisent la survie de la cellule en supprimant l'apoptose. La plupart des mitogènes PDGF, EGF, et TGF- β , des facteurs de croissance et des facteurs de survie se fixent sur des récepteurs de surface et activent des voies de signalisations intracellulaires.

Les mitogènes PDGF (**Platelet-Derived Growth Factor**), EGF (**Epidermal Growth Factor**) activent la cascade MAPK (**Mitogen Activated Protein Kinase**) via la GTPase « RAS ». Ceci conduit à l'activation du gène *myc* qui code pour un facteur de transcription. La protéine MYC déclenche la transcription de nombreux gènes parmi lesquels le gène *cycline-d* qui code pour une protéine qui active la protéine CDK-4, le gène *scf* qui dégrade les CKIs comme P27 et le gène *e2f* qui code pour le facteur de transcription qui à son tour activera la transcription des gènes nécessaires au bon déroulement de la phase S. L'activation de MYC permet l'entrée des cellules en phase S (Galaktionov et al., 1995).

Les facteurs de croissance activent la voie de signalisation qui implique la protéine PI3K (**PhosphoInositide 3-Kinase**) qui active entre autres les protéines ribosomiques S6 et le facteur d'initiation de la traduction EIF4E (**Elongation Initiation Factor 4E**). Ceci provoque l'augmentation de la synthèse protéique. Les facteurs de croissance activent également le facteur de transcription MYC. Certains signaux extracellulaires comme PDGF peuvent agir comme facteur de croissance et comme mitogène. Ceci permet aux cellules de garder une taille appropriée lorsqu'elles se divisent.

Les facteurs de survie activent des voies de signalisation qui contrôlent la mort cellulaire programmée par la régulation des membres de la famille des protéines BCL-2. Certains facteurs de survie stimulent les membres anti-apoptotiques et d'autres inhibent les membres pro-apoptotiques.

D'autres signaux extracellulaires inhibent la croissance, la division et la survie cellulaire. Par exemple, le TGF- β (**Transforming Growth Factor- β**) se fixe sur des récepteurs membranaires de surface qui initient une voie de signalisation intracellulaire qui conduit à la modification de l'activité des protéines SMADs (**Sma- and MAD-related protein 1**). Les SMADs à leur tour induisent la transcription des CKIs qui vont bloquer la prolifération. Des signaux d'inhibition de contact, de différenciation ou de stress peuvent également conduire à un arrêt du cycle cellulaire. Ces signaux activent également les CKIs.

On peut également noter le rôle majeur des protéines anti-apoptotique de la famille BCL-2 dans le contrôle du cycle cellulaire. Lorsque la cellule est privée de facteurs de croissance, les cellules surexpriment ces protéines anti-apoptotiques pour maintenir les cellules en G0 (Huang et al., 1997).

Transition G1->S

Cette transition permet l'activation du facteur de transcription E2F suite à la phosphorylation de la protéine RB (Giacinti and Giordano 2006). Au début de la phase G1, la cellule est sous le contrôle des complexes CYCLINE-D/CDK-4 et 6 qui, une fois activés,

initient la phosphorylation de la protéine RB (**Fig. 4** étape 1), l'inhibiteur du facteur de transcription E2F. Une fois hyperphosphorylée, RB libère le facteur de transcription E2F qui induit la transcription du gène *cycline-e* (**Fig. 4** étape 2). Le niveau de CYCLINE-E augmente jusqu'à activer CDK-2. Le complexe CYCLINE-E/CDK-2 induit à son tour la phosphorylation de RB (**Fig. 4** étape 3). Le facteur de transcription E2F libéré, transactive alors le gène de la CYCLINE suivante, la *cycline-a*.

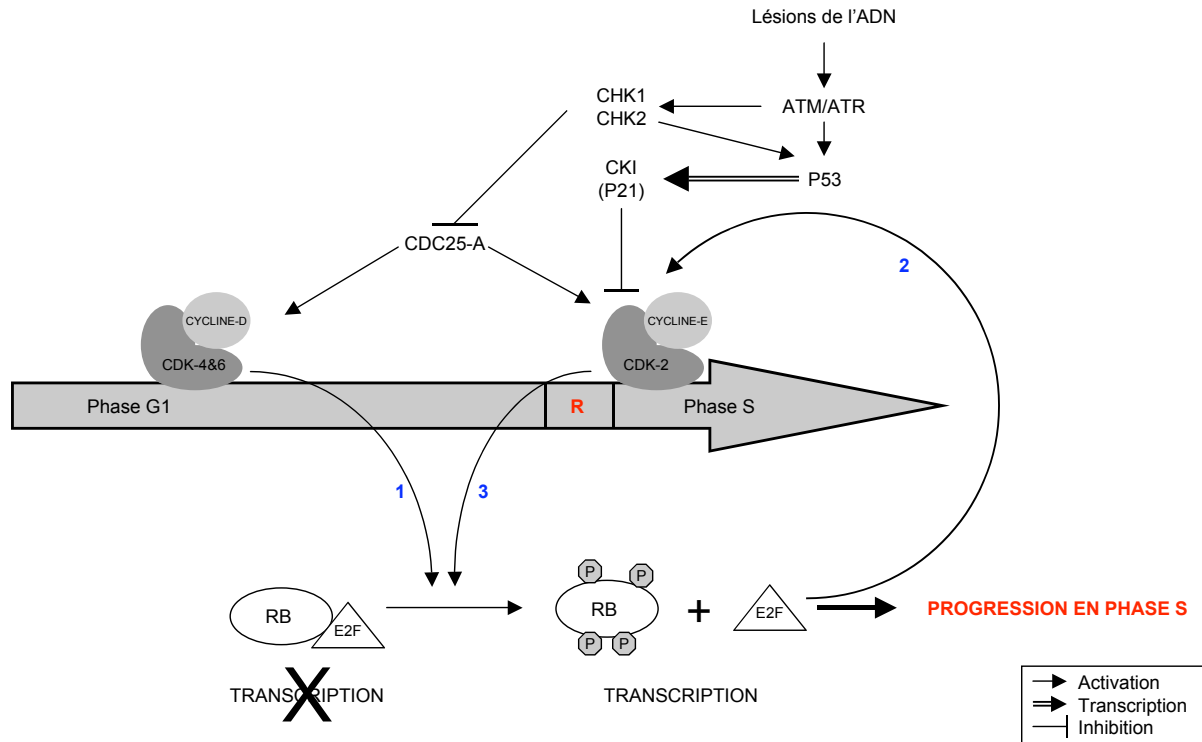


Figure 4 : Contrôle de la transition G1->S.

La transition G1->S se fait en trois étapes avant le point de restriction (R). Tout d'abord, les CDK-4 et 6 phosphorylent la protéine RB (1), ceci libère la protéine E2F qui va induire la transcription de la CYCLINE-E (2), qui active le complexe CYCLINE-E/CDK-2 qui phosphoryle à son tour RB (3). Ceci conduit à la transcription des gènes nécessaires à la transition G1->S. Les lésions à l'ADN induisent la cascade ATM/ATR qui vont phosphoryler les kinases CHK1/CHK2 qui vont inhiber la phosphatase CDC-25A et/ou activer P53 qui induira la transcription du gène p21 codant pour une protéine CKI. Ceci bloque les cellules en G1.

Si l'ADN est endommagé, la transition G1->S est bloquée. Les protéines ATM ou ATR sont recrutées par des protéines RAD17, RAD24 et MEC3 qui se lient aux cassures d'ADN. ATM/ATR activent alors les kinases CHK1/CHK2 et ceci aboutit à la phosphorylation de la phosphatase CDC25-A sur son résidu Sérine 216. La phosphatase CDC25-A sous cette forme phosphorylée est inactive. Les CDKs ne peuvent donc plus être déphosphorylées, le cycle cellulaire est bloqué en G1 (**Fig. 4**). D'autre part, la kinase CHK2 activée par la protéine ATM phosphoryle la protéine P53 sur les Sérines 9, 15 et 20. Ces phosphorylations stabilisent P53 et la protègent d'une dégradation par le protéasome. L'accumulation du facteur de transcription P53 dans le noyau induit l'expression de la protéine P21, une CKI des complexes CYCLINE-E /CDK-2 (El-Diery WS Cell 1993) (**Fig. 4**). La protéine P53 induit également la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose *bax*, *fas* ... et du gène *gadd45* qui va induire la réparation de l'ADN. La kinase ATM induit également la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BID (**BCL-2 Interacting domain Death agonist**) qui joue un rôle

dans la transition G1->S. Les souris déficientes en BID montrent un blocage des cellules en phase S (Zinkel et al., 2007). La combinaison de ces voies de signalisation permet à la cellule de ne pas s'engager dans la réplication de l'ADN si celui-ci est endommagé.

Transition G2->M

Cette étape est régulée par le complexe CYCLINE-B/CDK-1 (Taylor et al., 2001). La CYCLINE-B s'accumule progressivement pendant les phases S et G2 et à la fin de la phase G2, la cellule contient un stock de complexe CYCLINE-B/CDC-2 inactif puisque la CDC-2/CDK1/P34 est phosphorylée sur la Thréonine 161 par la kinase CAK mais aussi sur la Tyrosine 15 et la Thréonine 14 par les kinases WEE1 et MYT1. L'activation du stock de complexe CYCLINE-B/CDC-2 est le résultat d'une série de réactions indépendantes (**Fig. 5**).

À la fin de la réplication, les phosphatases CDC25-B et C sont activées, elles sont transloquées dans le noyau suite à une phosphorylation par la kinase PLK-1. Une fois activées, les phosphatases CDC25-B et C déphosphorylent une partie du stock du complexe CYCLINE-B/CDC-2, ces complexes activent à leur tour les CDC25-B et C en les phosphorylant sur un autre site. Dans un même temps, CYCLINE-B/CDC-2 phosphorylent WEE1 et MYT1 ce qui les inactivent. Le complexe CYCLINE-B/CDC-2 est capable d'activer ses propres activateurs (CDC25-B et C) et d'inactiver ses propres inhibiteurs (WEE1 et MYT1) (**Fig. 5**).

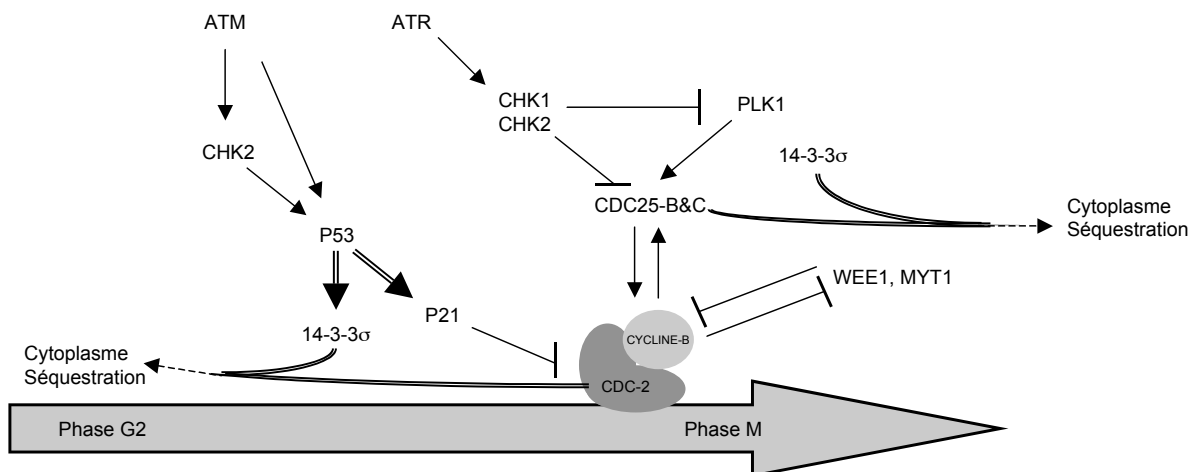


Figure 5 : Contrôle de la transition G2->M.

L'activation du complexe CYCLINE-B/CDC-2 se fait très rapidement. Une partie des complexes est activée par les phosphatases CDC-25B et C, une fois activés ils phosphorylent les CDC-25B et C pour les activer encore plus et ils phosphorylent les kinases WEE1 et MYT1 pour les rendre inactives. Ceci permet une transition rapide en Mitose. Les lésions à l'ADN entraînent l'activation des kinases ATM et ATR qui vont à leur tour activer les kinases CHK1 et CHK2 qui vont inactiver les phosphatases CDC-25B et C et activer le facteur de transcription P53. P53 induit la transcription du gène p21 codant pour un CKI et le gène 14-3-3σ qui participera à l'arrêt des cellules en G2 en séquestrant les protéines CDC-2 et CDC-25 dans le cytoplasme.

Ce double mécanisme de rétro-contrôle permet d'obtenir une activation rapide. L'activation massive du complexe CYCLINE-B/CDC-2 permet l'entrée irréversible en mitose et la phosphorylation de diverses protéines cibles mais tant que la réplication n'est pas terminée ou tant que l'ADN n'est pas réparé, la mitose n'est pas déclenchée. Pour cela deux types de réponse vont bloquer l'activation de CDC-2. Suite à des lésions de l'ADN ou une mauvaise réplication, les protéines ATM/ATR activées phosphorylent les kinases

CHK1/CHK2. Une fois actives, les kinases CHK1/CHK2 inactivent directement les phosphatases CDC25-B et C par phosphorylation ou indirectement en inhibant la kinase PLK-1. De plus, la kinase CHK2 active à son tour la phosphorylation et la stabilisation du facteur de transcription P53. Ce dernier induit la synthèse du CKI P21 qui inhibe le complexe CYCLINE-B/CDC-2 (**Fig. 5**). Les protéines CDC-2 et CDC25-B et C phosphorylées et inactives sont séquestrées dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 σ transcrite par P53. La grande diversité des voies de contrôle intervenant pour bloquer l'entrée en mitose d'une cellule en cas d'anomalies de l'ADN reflète l'importance de cette régulation qui garantit la répartition d'un ADN intact dans les deux cellules filles.

Si les lésions à l'ADN ne peuvent être réparées et menacent la survie de l'organisme, les cellules ne cherchent pas à poursuivre la division cellulaire et se suicident par le biais de la mort cellulaire programmée ou l'apoptose. Grâce à la grande précision de la régulation du cycle, les erreurs apparaissant lors du cycle cellulaire sont très rares. Cependant l'apparition de cellules tumorales aboutissant à un cancer s'observe régulièrement. La régulation et les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire font intervenir de très nombreuses protéines qui stimulent la prolifération ou l'inhibent. Toutes ces protéines peuvent présenter des mutations (CYCLINED, CDK4, les CKIs, RB ...) (Hall et al., 1996). Les protéines comme P53, ATM, RB... qui interviennent lors des points de surveillance du cycle cellulaire peuvent aussi être altérées (Barlow et al., 1996).

La mort cellulaire programmée

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le phénomène naturel qui conduit une cellule à la mort. Ce mécanisme a lieu par exemple lors du développement embryonnaire ou dans l'organisme adulte pour maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire et permettre le renouvellement de certains tissus ou lors de l'élimination d'une cellule anormale qui pourrait devenir dangereuse pour l'organisme. Les principaux mécanismes qui mettent en route l'apoptose sont le stress, le traitement par des substances cytotoxiques ou des corticoïdes, les lésions à l'ADN, la transmission d'un signal de mort ou la privation de facteurs de croissance. L'apoptose assure également la métamorphose du corps pendant le développement embryonnaire, elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme des bras, des jambes, elle élimine les tissus qui séparent les doigts permettant leur individualisation. L'apoptose participe également à la construction de nos deux organes de régulation les plus complexes qui sont notre cerveau et notre système immunitaire. L'apoptose est présente au sein de chaque cellule et permet l'auto-élimination physiologique de celle-ci.

La cellule peut aussi mourir par d'autres mécanismes cellulaires comme la nécrose, ou l'autophagie. La nécrose est une mort accidentelle de la cellule ; elle peut être provoquée par des causes variées comme la perte de l'homéostasie, la réduction de l'afflux sanguin, le manque d'oxygène dans le sang ou des toxines. Lors d'une nécrose, les cellules gonflent, éclatent et relarguent leurs contenus dans les espaces interstitiels provoquant une réaction inflammatoire. La nécrose provoque la mort de plusieurs cellules. Dans le cas de l'autophagie, c'est la cellule qui se détruit elle-même ; suite à un manque de nutriment, elle va digérer ces organites intracellulaires par une séquestration de ces composants dans des grandes vacuoles ou autophagosomes destinés à être digérés par les enzymes du lysosome.

Lorsqu'une cellule est en apoptose, des modifications morphologiques et biochimiques très caractéristiques apparaissent. Morphologiquement, on observe une diminution du volume

cellulaire, une relocalisation des organites cytoplasmiques, la chromatine se condense puis le noyau et le cytoplasme se fragmentent. La cellule se scinde en corps apoptotiques délimités par une membrane intacte. Biochimiquement, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, les Phosphatidylserines de la membrane plasmique sont externalisées, les protéases et les CASPASEs s'activent et l'ADN se fragmente en segments de haut poids moléculaires. Des marqueurs de surface permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages dans lesquels elles subissent une dégradation rapide. La sécrétion de cytokines va inhiber la réaction inflammatoire.

Les protéines qui régulent l'apoptose

L'apoptose résulte d'un programme hautement régulé qui consiste en plus de la participation de la protéine P53, en l'activation d'enzymes (les CASPASEs) et l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques (les gènes de la famille BCL-2) qui vont induire la destruction d'une cellule en préservant l'intégrité tissulaire environnante.

Les gènes de la famille BCL-2

Les membres de cette famille ont une importance dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Tous les signaux régulateurs de l'apoptose à quelques rares exceptions semblent être modulés par les gènes de cette famille. Cette régulation se fait en amont de l'activation des CASPASEs. Les gènes de la famille BCL-2 sont des homologues des CED-9 découverts tout d'abord chez *Caenorhabditis elegans* (Hengartner et al., 1994). C'est une famille de gènes très conservés au cours de l'évolution qui possèdent sur leurs séquences protéiques une à quatre régions de forte conservation appelées domaines BH (**BCL-Homology Domain**) permettant leur dimérisation et leur activation. Une grande majorité des protéines de cette famille contiennent en leur extrémité C-terminal une région hydrophobe (TM) leur permettant de s'ancrer dans les membranes externes des mitochondries mais aussi dans les membranes du noyau et du RE.

Les membres de cette famille sont classés en trois groupes (Borner et al., 2003)

1) Les protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-xL, BCL-W, MCL-1, A1/BFL-1, BOO/DIVA, BRAG-1, BCL-xES, BCL-B, BCL-2-L-10, NR-13). Les membres de ce groupe contiennent trois à quatre domaines BH.

2) Les protéines pro-apoptotiques (BAX, BAK, BCL-RAMBO, BCL-gL BOK/MTD, BCL-xS). L'absence du domaine BH4 peut expliquer leur fonction pro-apoptotique.

3) Les « BH3-only » car elles ne possèdent qu'une seule séquence homologue. Il s'agit des protéines BID, BAD, BIK/NBK/MBLK, BLK, HRK/DP5, BIM/BOD, BNIP3/NIX/BNIP3L, BNIP1/BNIP1B, NOXA, MAP-1, BCL-gS, PUMA/BBC3, BMF, MCL-1S, ITM2BS, APO6L et SPIKE. Les BH3-only le plus souvent localisées dans le cytoplasme sont transloquées à la membrane externe de la mitochondrie suite à une activation. Tous les membres de ce groupe sont des pro-apoptotiques ; ils inhibent les membres anti-apoptotiques et certains comme BID après activation peuvent stimuler les membres pro-apoptotiques.

Ces trois groupes de protéines ont des localisations cellulaires différentes. Les protéines anti-apoptotiques siègent au niveau des membranes cellulaires des mitochondries, du noyau ou du RE. Les protéines pro-apoptotiques ont une localisation cytoplasmique ou près des microtubules. Toutes ces protéines fonctionnent en homodimère ou hétérodimère conduisant à un nombre important de combinaison et suggérant une neutralisation de leur action par compétition. C'est ce qui permet de faire la balance entre la mort ou la survie de la cellule. Les membres anti-apoptotiques en particulier BCL-2 et BCL-xL normalement localisé au

niveau de la membrane externe de la mitochondrie ont pour rôle d'inhiber la perméabilisation de la membrane. Ils assurent le fonctionnement des pores PTP (**P**ermeability **T**ransition **P**ore) et empêchent le relargage du Cytochrome C (CYT-C) (molécule nécessaire à l'activation des CASPASEs). Les membres anti-apoptotiques favorisent ainsi la survie cellulaire. Les membres pro-apoptotiques en particulier BAX (**B**cl2-**A**ssociated protein **X**), BAK (**B**CL-2 **A**ntagonist/**K**iller) et BAD (**B**CL-2 **A**ntagonist of cell **D**eath) ont pour rôle de s'insérer au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et d'augmenter la perméabilité pour favoriser la libération des facteurs apoptogènes. Ils changeraient de conformation à la suite d'un signal apoptotique afin de s'ancrer à la membrane externe des mitochondries, de permettre l'ouverture des pores PTP et faciliter la libération de facteurs apoptogènes.

Les membres de la famille BCL-2 peuvent être régulés de différentes façons ; par clivage, par modifications post-traductionnelles, par translocations ou par une régulation transcriptionnelle. Par exemple, à la suite de signaux apoptotiques, la protéine BAD déphosphorylée forme des hétérodimères avec BCL-xL et BCL-2 pour les inhiber. À la suite de l'activation des récepteurs de mort, la protéine pro-apoptotique BID est clivée par la CASPASE-8 et génère la protéine tronquée T-BID (**T**runcated-**B**ID) qui vient se lier à BAX et BCL-2 à la mitochondrie et permet la libération de CYT-C et la libération de facteurs apoptogènes. À la suite d'une privation en facteur de croissance ou de dommages causés par des radiations UV, la protéine BIM (**B**CL-2 **I**nteracting **M**ediator of cell death) est relarguée dans le cytosol et se lie aux membres pro-apoptotiques pour être active. Enfin les protéines BAX, BCL-2, PUMA (**P**53 **U**p-regulated **M**odulator of **A**ppoptosis) ou NOXA (**N**OXious) subissent une régulation transcriptionnelle par le gène suppresseur de tumeur P53.

Les CASPASEs

La famille des CASPASEs (**C**ysteine **A**SPartate-specific prote**A**SEs) contient 17 membres qui sont synthétisés à l'état de précurseurs inactifs « Pro-CASPASEs ». Parmi ces dix-sept protéines, seulement sept vont intervenir dans le mécanisme d'apoptose, les autres interviennent plutôt pendant le processus d'inflammation. Certaines CASPASEs sont séquestrées dans les mitochondries et sont libérées avec d'autres facteurs apoptogènes CYT-C, ENDO-G, AIF, SMAC/DIABLO ... dans le cytoplasme suite à des signaux apoptotiques.

Il existe 2 sortes de CASPASEs :

- 1) Les CASPASEs initiatrices ou régulatrices (CASPASE-2,8,9 et 10) qui possèdent des pro-domaines longs comme les domaines effecteurs de mort pour CASPASE-8 et 10 ou des domaines qui permettent leur recrutement au niveau de complexes protéiques comme CASPASE-2 et 9.
- 2) Les CASPASEs effectrices ou exécutrices (CASPASE-3,6 et 7) qui possèdent un pro-domaine court. Ces CASPASEs effectrices une fois activées, sont directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose et leur activation par les CASPASEs initiatrices aboutit à un processus irréversible. Elles sont à l'origine de la fragmentation de l'ADN et du noyau, l'inhibition du potentiel mitochondrial, la réorganisation de la membrane plasmique et la modification du cytosquelette (Nicholson et al., 1997).

Les CASPASEs actives possèdent une structure tétramérique et comprennent deux sites catalytiques. On connaît à ce jour plusieurs centaines de substrats aux CASPASEs. Il s'agit de protéines impliquées dans la structure du noyau et du cytoplasme : ACTINE, LAMINES ; dans les voies de signalisations : C-ABL, RAF-1, NF-κB, P65, P50 ; dans la régulation du cycle cellulaire : MDM2, RB ; dans la réparation de l'ADN : PARP (**P**oly **A**DP-**R**ibose **P**olymerase) et dans la régulation de l'apoptose : BCL-2, BCL-xL (Timmer et al., 2007).

Les IAPs (Inhibitor Apoptosis Proteins)

Les IAPs (NIAP, XIAP, CIAP1, CIAP2, KIAP, ILP-2, APOLLON et SURVIVIN) inhibent l'apoptose en bloquant l'activation des Pro-CASPASEs ou en inhibant l'activité des CASPASEs effectrices 3 et 7 en se fixant directement dessus (Schimmer et al., 2004). L'expression de CIAP1 et CIAP2 est activée par la voie de signalisation intracellulaire qui implique NF- κ B (Nuclear Factor B) suite à des signaux de survie cellulaire.

Les inhibiteurs des IAPs

Les IAPs peuvent aussi être inhibés par d'autres protéines comme SMAC/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspase/Direct IAP Binding Caspases), XAF-1 (XIAP Associated Factor-1) et OMI/HTRA2 (High Temperature Regulated protein A2) (Nachmias et al., 2004). La protéine XAF-1 séquestre la protéine XIAP (X-linked IAP) dans le noyau, les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2 relarguées par les mitochondries séquestrent les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs), ce qui induit la mort de la cellule par apoptose.

Les mécanismes généraux de l'apoptose

Les mitochondries sont au carrefour de la régulation de l'apoptose ; elles ont la capacité d'intégrer des signaux de deux voies distinctes : la voie intrinsèque qui correspond à une perturbation de l'homéostasie intracellulaire et la voie extrinsèque déclenchée par des signaux extracellulaires (Bras et al., 2005). Ces deux voies aboutissent à l'activation des CASPASEs (Fig. 6). D'autres voies de signalisation s'ajoutent à ces deux voies, elles sont indépendantes des CASPASEs. L'une met en jeu une protéine mitochondriale AIF (Fig. 6). Le RE apparaît également comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress.

L'apoptose par l'activation des CASPASEs

Les trois principales fonctions des mitochondries sont : *i*) la production d'énergie sous forme d'ATP grâce à un processus de phosphorylation oxydative au niveau de la membrane interne, *ii*) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme les anions superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou les radicaux hydroxyl OH et *iii*) la régulation de l'apoptose. L'apoptose se déroule en trois phases. Une phase d'initiation pendant laquelle la mitochondrie reçoit des signaux inducteurs de l'apoptose qui peuvent provenir de l'activation de la protéine P53. Une phase de décision contrôlée par les membres de la famille BCL-2 et qui entraîne la perméabilisation des membranes mitochondriales et permet la libération de facteurs apoptogènes comme le CYT-C, les Pro-CASPASEs, les AIF, l'ENDO-G ou les IAF inhibiteurs. Ces deux premières phases sont réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques. Enfin la troisième et dernière phase irréversible de dégradation met en jeu des CASPASEs et des DNASEs qui dégraderont de nombreux constituants cellulaires.

La voie intrinsèque est initiée suite à des perturbations de l'homéostasie intracellulaire qui sont des signes de stress cellulaire comme une diminution de l'apport en nutriments, une accumulation des ROS, un déséquilibre ionique, une désorganisation du cytosquelette, ou un ADN endommagé. L'accumulation de signaux apoptotiques va activer le facteur de transcription P53 qui va induire la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2. Cette activation de gène va induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération de facteurs apoptogènes. La protéine P53 inactive également les membres anti-apoptotiques ainsi que les IAPs.

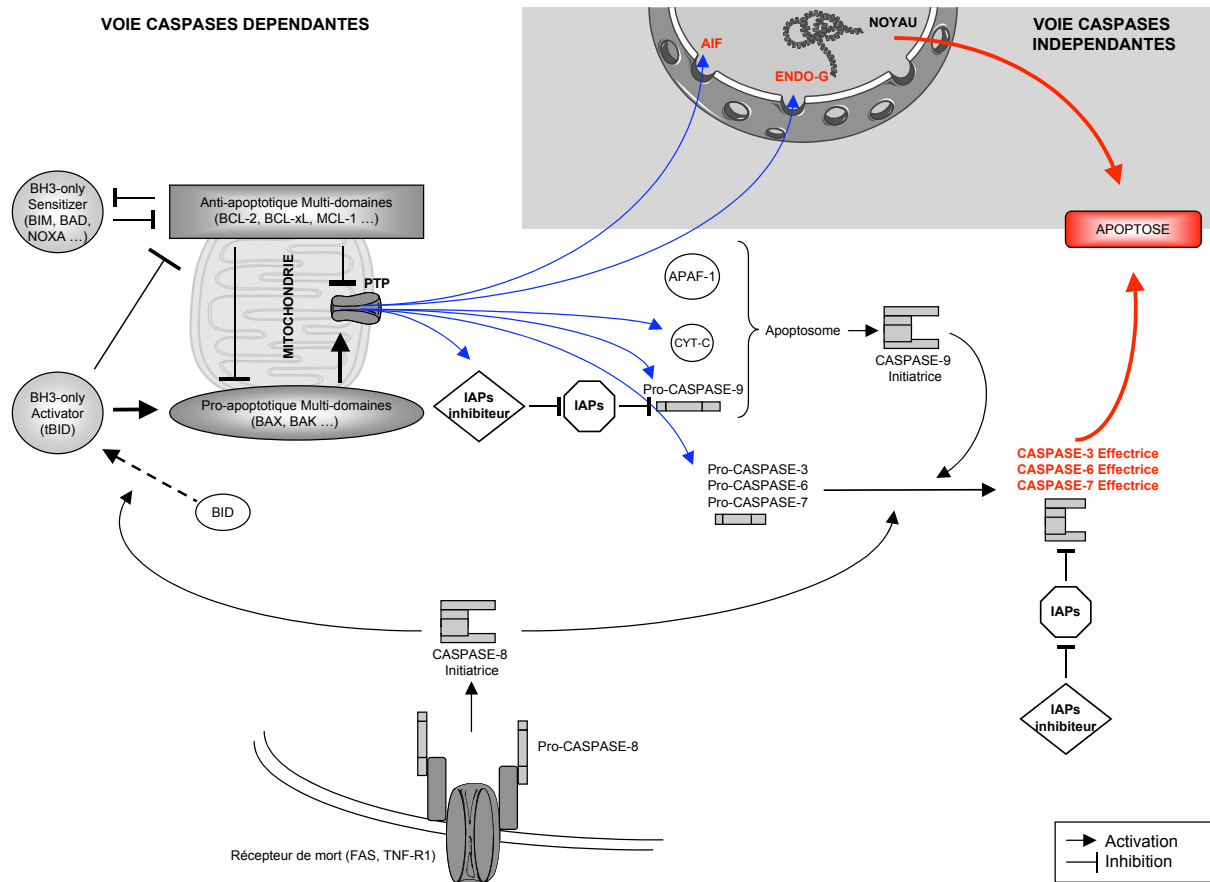


Figure 6 : Représentation schématique des voies de l'apoptose dans la cellule.

La voie qui induit l'apoptose indépendamment des caspases fait intervenir deux protéines AIF et ENDO-G libérées par la mitochondrie qui vont fragmenter l'ADN nucléaire de la cellule. La voie qui fait intervenir les caspases peut être déclenchée de deux façons, soit de l'intérieur c'est la voie intrinsèque, soit de l'extérieur via les récepteurs de mort (FAS et TNF-R1) c'est la voie extrinsèque.

La voie extrinsèque est initiée à la surface des cellules par la liaison de ligands de mort cellulaire : TNF α (Tumor Necrosis Factor α), FASL/CD95, DR3L/TWEAK et TRAIL (Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand) avec des récepteurs présents à la membrane de la cellule. Les récepteurs les plus décrits sont les membres de la super famille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor-Receptor) : TNF-R1, TNF-R2, CD95/FAS/APO1, DR3/APO3/TRAMP, DR4/TRAIL-R1, DR5/APO2/KILLER/TRAIL-R2 et DR6. On parle de récepteurs de mort ou « Death Receptor ». L'activation de ces récepteurs peut induire la prolifération, la survie ou la différenciation de la cellule mais aussi l'apoptose (Khosravi-Far et al., 2004). Les récepteurs FAS et TNF-R1 possèdent dans leur structure un domaine de mort qui va leur permettre le recrutement de protéines particulières et la transmission d'un signal apoptotique. L'activation des récepteurs TNF-R1 et FAS par la fixation des ligands TNF α ou CD95/FASL respectivement, va tout d'abord induire la trimérisation de ces récepteurs. Cette trimérisation permet le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques comme TRADD (TNF-Receptor Associated Death Domain), FADD (Fas-Associated Death Domain) ou RIP (Receptor-Interacting Protein). Ces protéines recrutent alors les Pro-CASPASE-8 en se liant aux domaines effecteurs de mort, formant le complexe : casposome. Pendant la formation de ce complexe, la Pro-CASPASE-8 est immédiatement convertie en CASPASE-8 et libérée du complexe. La CASPASE initiatrice active alors les CASPASE-3,6

et 7 permettant l'amplification du signal apoptotique et enfin, les CASPASEs effectrices clivent de nombreux substrats provoquant l'apoptose. Dans d'autres cellules où la quantité de Pro-CASPASE-8 est trop faible, la cascade des CASPASEs est amplifiée par la mitochondrie, la CASPASE-8 clive la protéine pro-apoptotique BID et génère la protéine tronquée t-BID qui s'ancre à la mitochondrie pour activer les membres pro-apoptotiques de la famille des BCL-2 et inhiber les membres anti-apoptotiques. Ceci permet la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération du CYT-C et d'autres facteurs apoptogènes.

D'autres agents appelés TNF-like comme les UV, les γ -irradiations, les molécules chimiothérapeutiques, les virus, les bactéries ou les signaux de privation en cytokines ou en facteurs de croissance empruntent cette voie des récepteurs pour induire l'apoptose. Le récepteur TNF-R1 peut également induire des signaux de survie en recrutant les protéines TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2). Ceci conduit à l'inhibition des CASPASEs et à l'activation des MAPK qui activent à leurs tours le facteur de transcription NF- κ B qui est un répresseur de l'apoptose en activant la transcription de gènes anti-apoptotiques comme *bcl-2* et *bcl-xL*.

Suite à la perméabilisation mitochondriale, la mitochondrie libère de nombreux facteurs apoptogènes comme le CYT-C, des Pro-CASPASEs et les inhibiteurs des IAPs. Parmi les constituants apoptogènes libérés par la mitochondrie lors de la perméabilisation de sa membrane, la sécrétion du CYT-C a beaucoup été étudiée. Le CYT-C est d'abord traduit sous une forme inactive l'apo-CYT-C qui est une protéine cytoplasmique. Lors de son transport dans la mitochondrie, elle est transformée sous une forme globulaire liée à un noyau d'hème l'holo-CYT-C. Celle-ci est séquestrée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial ou elle participe à la chaîne respiratoire mitochondriale. La libération de CYT-C peut être bloquée par la protéine anti-apoptotique BCL-2. Suite à un stimulus apoptotique, le CYT-C est libéré de la mitochondrie vers le cytoplasme où il s'associe au domaine C-terminal de la protéine APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) dans une région riche en motifs répétés « WD » connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ceci facilite la fixation de l'ATP sur APAF-1 qui se dimérise par ces domaines N-terminal. C'est la formation du complexe : apoptosome. La formation de ce complexe s'accompagne du recrutement de la Pro-CASPASE-9 elle aussi libérée par la mitochondrie. Cette liaison permet son activation en CASPASE-9. C'est l'activation de la CASPASE-9 qui va permettre d'enclencher la troisième phase de l'apoptose, cette dernière va activer les CASPASEs effectrices qui sont responsables de la dégradation des constituants par clivage.

Les voies indépendantes des CASPASEs

Lors de la phase d'exécution, la mitochondrie libère en plus du CYT-C et des CASPASEs, les protéines AIF et ENDO-G qui vont être transportées dans le noyau pour y cliver l'ADN. La protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67kDa constitué de trois domaines protéiques. Une fois transportée dans la mitochondrie, elle perd son domaine N-terminal et donne naissance à sa forme mature : une flavoprotéine de 57kDa. Suite à un stimulus apoptotique, la flavoprotéine est libérée de la mitochondrie et est transloquée dans le noyau où elle induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaire. La surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 bloque la translocation de la protéine AIF dans les cellules eucaryotes (Daugas et al., 2000). La protéine ENDO-G (Endonucléase G) est une endonucléase mitochondriale qui a pour rôle la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose, elle est libérée par la mitochondrie et transloquée dans le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li, Luo et al., 2001). L'action combinée des protéines AIF et ENDO-G,

toutes les deux relarguées par la mitochondrie, est un mécanisme totalement indépendant des CASPASEs qui provoque la fragmentation de l'ADN.

L'apoptose via le Réticulum Endoplasmique (RE)

La mitochondrie n'est pas le seul organe intracellulaire impliqué dans l'apoptose. Le RE qui intervient dans la rétention du calcium intracellulaire, maintient l'homéostasie calcique. Le RE est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Les facteurs capables de perturber le fonctionnement du RE sont l'inhibition de la glycosylation des protéines, la réduction de la formation des ponts di-sulfures protéiques, la chute du calcium intra-RE ou le blocage du transport des protéines du RE à l'appareil de Golgi (Golgi). L'apoptose induite par une perturbation de la régulation du calcium est aussi régulée par les membres de la famille des protéines BCL-2 (BCL-2, BAX, BAK) qui agissent sur la perméabilité des membranes du RE (Bassik et al., 2004) (Scorrano et al., 2003).

La résistance à l'apoptose est également une caractéristique importante des cellules cancéreuses afin de pouvoir proliférer et survivre là où elles ne le devraient pas. Un certain nombre de mutations découvertes dans les tumeurs se trouvent sur les gènes qui régulent l'apoptose comme les membres de la famille BCL-2. Certaines mutations provoquent la surexpression des protéines anti-apoptotiques. Le gène *bcl-2* (Chr. 14) passe sous le contrôle de l'enhancer de IgH (Chr. 18) dans de nombreuses leucémies ALM (Acute Myelogenous Leukemia), ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia), CML (Chronic Myelogenous Leukemia) et lymphomes (Reed et al., 1996). Les gènes *mcl-1* (Myeloid Cell Leukemia sequence 1) et *bcl-xL* sont également surexprimés dans des leucémies (Packham et al., 2005). D'autres mutations induisent une inhibition des protéines pro-apoptotiques. Dans des cancers du côlon, la protéine BAX est déficiente (Meijerink et al., 1998). Les récepteurs de mort FAS/CD95, TRAIL-R1 et R2 sont trouvés non fonctionnels dans des leucémies et d'autres cancers (Ozören et al., 2003) (Rubio-Moscardo et al., 2005). La perte de la protéine APAF-1 est la conséquence de nombreux mélanomes et autres cancers, inhibant la formation de l'apoptosome (Wolf et al., 2001). Une surexpression des IAPs peut également être à l'origine de cancer en bloquant l'activation des CASPASEs (Watson et al., 2005).

2 - LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Comment une cellule devient-elle tumorale ? C'est la question à laquelle la plupart des chercheurs travaillant en cancérologie essayent de répondre.

Le cancer est une maladie génétique acquise et non héréditaire. C'est à la fois une pathologie multigénique car plusieurs gènes sont altérés et somatique car seuls les gènes des cellules cancéreuses sont modifiés. Le cancer se différencie donc des autres pathologies génétiques constitutionnelles qui sont monogéniques comme la mucoviscidose ou polygéniques comme l'hypertension où toutes les cellules de l'organisme, gamètes inclus, possèdent un gène muté et peuvent donc transmettre la maladie à la descendance. Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme qui ont échappé aux contrôles de la différenciation et de la régulation de leur prolifération.

L'instabilité génétique

Le cancer est la conséquence d'une altération de l'ADN : mutations, délétions ou remaniements chromosomiques par translocation ou amplification. Plusieurs changements génétiques sur des gènes importants qui contrôlent les grands processus comme la division cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou la communication intercellulaire sont nécessaires pour induire le développement d'un cancer. Typiquement, il faut 7 à 10 changements génétiques sur ces gènes acquis au cours de la vie pour induire la cancérisation. La probabilité de développer un cancer chez l'homme augmente donc avec l'âge mais aussi avec les facteurs génétiques dont il a hérité (Vogelstein et al., 1993). Ces altérations génétiques peuvent être provoquées par différents facteurs, qu'ils soient physiques comme les rayons X ou UV, biologiques comme les virus ou les bactéries ou chimiques comme les molécules carcinogènes présentes dans l'air, l'eau ou sur les lieux de travail. Le tabac, l'alcool, les habitudes alimentaires, l'environnement et l'hérédité peuvent aussi être à l'origine de cancer. L'ensemble de ces modifications génétiques sont la conséquence d'une instabilité génétique, la caractéristique principale des cellules cancéreuses qui leur permettent d'évoluer dans l'organisme et de résister aux traitements thérapeutiques. Cette instabilité apparaît dès le stade le plus précoce dans les cellules cancéreuses et ne fait que s'aggraver au cours de la transformation. Les conséquences sont une accumulation de mutations et d'aberrations génomiques dans les cellules cancéreuses, et des tumeurs de plus en plus agressives.

On peut distinguer trois étapes dans la genèse d'un cancer :

a) La phase d'initiation durant laquelle la cellule acquiert des mutations irréversibles sur son ADN, spontanément ou suite à une exposition à un carcinogène. Ces cellules « initiées » n'ont pas encore les propriétés d'une cellule tumorale, elles n'ont pas acquis l'autonomie de croissance. À ce stade, on ne peut pas distinguer les cellules initiées des cellules normales.

b) Durant la phase de promotion, les cellules initiées prolifèrent. Un carcinogène ne peut pas à lui seul provoquer un cancer, mais les divisions cellulaires successives vont augmenter le risque de mutations ainsi que le risque de voir ces mutations transmises aux cellules filles sans réparation de l'ADN. Les cellules acquièrent un phénotype malin et l'on parle à cette étape de cellules tumorales.

c) Enfin durant la phase de progression, la cellule va acquérir les propriétés des cellules cancéreuses : une multiplication non contrôlée, une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et d'ancrage, la perte de la différenciation, la capacité d'invasion locale et de métastases et la formation de néo-vaisseaux permettant l'irrigation de la tumeur ou angiogénèse. Cette dernière phase de progression se prolonge dans le temps. Les cellules tumorales se divisent et la multiplication des divisions cellulaires favorise l'apparition d'erreurs de réplication qui entraînent de nouvelles mutations. La tumeur devient de plus en plus agressive et à long terme, ces cellules tumorales vont se transformer en métastases et vont envahir le tissu normal avoisinant

Les cellules cancéreuses présentent plusieurs types d'anomalies :

- a) Des anomalies morphologiques : anomalie des molécules d'adhérences, du cytosquelette, des organites intracellulaires, de la chromatine
- b) Des anomalies chromosomiques
- c) Des anomalies de prolifération
- d) Des anomalies génétiques : délétions, mutations et remaniements chromosomiques numériques et structuraux.

Les anomalies de prolifération des cellules cancéreuses en font des avantages sélectifs leur permettant une prolifération aux dépens des cellules normales. Ces cellules cancéreuses ont la capacité de croître exagérément par une production autocrine de facteurs de croissance, de proliférer par inactivation des mécanismes qui régulent le cycle cellulaire, d'échapper au mécanisme de l'apoptose par sécrétion autocrine de facteurs de survie et hyper-expression de protéines anti-apoptotiques. Elles ont également la capacité de se diviser de façon illimitée par immortalisation et activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomérases, d'induire une néo-angiogénèse et la capacité d'invasion et de métastases.

Les altérations génétiques qui sont à l'origine des cancers sont des altérations qui toucheront quatre catégories de gènes. Les gènes qui stimulent la prolifération cellulaire, les gènes qui freinent la croissance, les gènes qui réparent l'ADN et maintiennent l'intégrité de la cellule et les gènes de l'apoptose. Une récente étude estime à 120 le nombre de gènes pouvant être mutés (Greenman et al., 2007). Ces gènes sont classés selon deux catégories : les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes. Les gènes suppresseurs, les gènes « freins », ont d'abord été désignés pour leur régulation négative de la prolifération et sont inhibés dans les cellules tumorales induisant une croissance incontrôlée des cellules. Les oncogènes, les gènes « accélérateurs », au contraire, ont été identifiés pour leur régulation positive sur le cycle cellulaire et sont hyper-actifs dans la cellule tumorale stimulant encore plus la prolifération.

Les proto-oncogènes

Les oncogènes existent sous deux formes : les proto-oncogènes ou oncogènes cellulaires (c-oncogènes) qui sont des protéines codées par des gènes naturellement présents dans le génome des eucaryotes et les oncogènes viraux (v-oncogènes) qui sont des protéines codées par des gènes viraux. Les virus sont capables d'intégrer leurs v-oncogènes dans les cellules eucaryotes. À l'état sauvage, on parle de proto-oncogènes ; ce n'est qu'une fois que la protéine est modifiée qu'on parle d'oncogènes. Les oncogènes ont été découverts à la suite d'études sur les rétrovirus ayant la capacité de transformer les cellules en utilisant des modèles animaux. Lors de l'infection d'une cellule, l'ARN (Acide Ribo Nucléique) rétroviral est copié en ADN grâce à la transcriptase inverse. Cette copie d'ADN (provirus) va

s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule hôte. Certains rétrovirus ont un pouvoir oncogénique qu'ils exercent de deux manières ; par insertion (le génome viral s'incorpore dans l'ADN chromosomique de la cellule infectée) ou par transduction (le provirus s'intègre en amont d'un proto-oncogène cellulaire et entraîne la fusion du provirus au proto-oncogène). À la suite de ces événements, l'expression du gène cellulaire échappe à sa régulation normale et passe sous le contrôle des éléments de régulation viraux avec ou sans modification de son produit. Le premier oncogène viral découvert par Bishop et Varmus fut le gène *v-src* (*v-src* sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog) du virus du sarcome de poulet (Stehelin et al., 1976).

Dans le cas des oncogènes, on parle de mutations « gain de fonction ». En effet ces gènes à l'état sauvage qui régulent le cycle cellulaire et activent la prolifération vont subir des mutations qui vont augmenter leurs fonctions et permettre la croissance anarchique des cellules cancéreuses. Les mutations qui touchent ce genre de gènes sont des mutations dominantes, une mutation sur un seul allèle peut provoquer un cancer. Il s'agit de mutations somatiques qui n'existent pas dans les cellules germinales et qui ne pourront pas être transmises de façon héréditaire. Les proto-oncogènes peuvent être activés de plusieurs façons, soit au niveau de la régulation de leur expression soit au niveau de leur structure protéique.

Il existe trois grands types de modifications génétiques qui peuvent altérer un proto-oncogène : les mutations, les translocations et les amplifications géniques. Dans tous les cas, on obtient un produit hyperactif qui stimule la division cellulaire de sorte qu'elle échappe à la régulation normale.

1) Mutations ponctuelles. Elles sont souvent dues à des carcinogènes chimiques ou des rayonnements. Les gènes de la famille RAS (Rat Sarcoma virus oncogene) sont des protéines G qui interviennent dans la transduction du signal. Elles existent sous deux formes : inactives sous forme GDP (**G**uanosine **D**i-**P**hosphate) et actives sous forme GTP (**G**uanosine **T**ri-**P**hosphate). Elles sont activées lorsque le facteur de croissance EGF se lie à son récepteur EGF-R (**E**pidermal **G**rowth **F**actor-**R**eceptor). La mutation du codon 12 du gène *ras* provoque une activation constitutive (Lowy et al., 1993).

2) Remaniements chromosomiques par translocation ou inversion. Une translocation est le résultat d'un échange de matériel entre deux chromosomes (Chr.). Cet échange provoque des juxtapositions aberrantes ou des fusions "illégitimes" de gènes. Ceci peut avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles. La translocation chromosomique réciproque entre le Chr. 9 et le Chr.22 génère une protéine de fusion entre les proto-oncogènes *c-abl* et *bcr*. Le transfert du nouveau gène *bcr-abl* (**B**reakpoint **C**luster **R**egion-**A**bl) dans des cellules myéloïdes de souris provoque le développement d'une leucémie (Bartram et al., 1983). Le gène *c-myc* (Chr. 8q24) codant pour un facteur de transcription passe sous le contrôle de l'enhancer de IgH (Chr. 14q32) dans les tumeurs des lymphocytes B (Taub et al., 1982).

3) Amplifications géniques. Cela correspond à une augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule sous forme intégré dans le chromosome ou sous forme de mini-chromosomes. Les gènes fréquemment amplifiés dans les cancers humains sont : *n-myc* et *l-myc* dans les neuroblastomes, *c-erb-B2/Her2/Neu* (*v-erb-b2* erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2/**H**uman **E**pidermal growth factor **R**eceptor 2/**NEU**ro/glioblastoma derived oncogene homolog) dans les cancers du sein, *c-myc* dans les tumeurs du sein, des ovaires et des poumons ou *cycline-d* dans les carcinomes du sein.

Les protéines oncogéniques sont essentiellement des régulateurs de la prolifération et du cycle cellulaire.

- Les facteurs de croissance : SIS/PDGF, EGF, INT-2/FGF, KS3, HST et les récepteurs de ces facteurs de croissance : FMS/M-CSF, ERB-B/EGF-R, KIT, ROS, CSF-R, ERB-B2/NEU/HER-2, MET, TRK, RET, FPS qui permettent le transfert de signaux extracellulaires.

- Les tyrosines kinases et les sérines thréonines kinases : C-SRC, P60, YES, FGR, FPS, FES, RAS, BCR-ABL, MOS, RAF, MIL, RET ainsi que les protéines G : H-RAS, K-RAS, N-RAS qui sont impliquées dans la transmission de signaux.

- Les protéines qui régulent directement le cycle cellulaire : CYCLINES et CDKs et celles qui induisent la transcription de nombreux gènes : L-MYC, N-MYC, C-MYC, MYB, C-FOS, SKI, C-JUN, REL, ETS.

Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des régulateurs négatifs de la croissance cellulaire. Un gène suppresseur de tumeurs, à l'inverse d'un oncogène, n'est plus exprimé dans les cellules cancéreuses. Son expression est éteinte par mutation ponctuelle au sein de sa séquence d'ADN, par hyper-méthylation de son promoteur ou par délétion d'une région du chromosome contenant le gène. L'absence ou la déficience de ce gène dans la cellule peut être à l'origine de certains cancers (Weinberg et al., 1991). Selon la théorie de Knudson « Two Hit Hypothesis », deux altérations génétiques sont nécessaires pour la formation d'une tumeur, une sur chaque allèle (Knudson et al., 1971). Il faut avoir perdu les deux allèles pour que le gène suppresseur de tumeur n'exerce plus son action et qu'il participe à la cancérogenèse. Un des deux événements peut être transmis par hérédité (syndrome de Li-Fraumeni), on parlera alors de mutation germinale. Le deuxième événement se passe au niveau somatique. La perte du second allèle appelé Loss of hétérozygotity (LOH) est une étape commune dans l'initiation de la transformation.

Les gènes suppresseurs de tumeurs codent le plus souvent pour des protéines nécessaires à freiner le cycle cellulaire notamment en réprimant les oncogènes :

- Les protéines P53, RB, WT1, BRCA1 et BRCA2. Elles induisent la transcription de gènes, elles sont responsables de l'apoptose, de l'arrêt du cycle cellulaire ou de la réparation de l'ADN.

- Les protéines nucléaires qui jouent le rôle d'inhibiteurs des CDK : P16^{INK4A}/MTS1, P15^{INK4B}/MTS2, P21/WAF1/CIP1, P27, P57, P19^{INK4D}, P18^{INK4C}.

- Les protéines qui réparent l'ADN : MLH1, MLH2, MSH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1, PMS2 et celles qui transmettent le signal en cas de lésions à l'ADN : ATM et ATR.

La protéine P53

Par sa position centrale, P53 est la première protéine qui va provoquer un cancer en cas de déficience. P53 est un gène suppresseur de tumeur (Finlay et al., 1989). Dans de nombreuses tumeurs, la fonction de cette protéine est altérée. La protéine P53 est inhibée par liaison avec des oncogènes et des protéines virales pour conduire à la transformation de la cellule. Lorsque la protéine P53 est réinjectée dans ces cellules tumorales, les cellules reversent de leur état tumoral. Les mutations de P53 donnent un avantage sélectif pour les cellules puisqu'elles ne sont plus réprimées au niveau de leur croissance, elles ne meurent pas par apoptose et leur ADN n'est pas réparé. Les cellules déficientes en P53 se divisent avec des anomalies génétiques importantes favorisant le développement de cancers. Les souris knockout pour le

gène *p53* sont prédisposées à développer des tumeurs dès l'âge de six mois (Donehower et al., 1992). La surexpression de la protéine MDM2 ou la délétion de la protéine P14(ARF), des régulateurs directs de P53, vont également être la cause de nombreuses tumeurs (Zhang et al., 2000) (Oda et al., 2005).

La protéine P53 est souvent décrite comme « le gardien » du génome (Lane et al., 1992). Elle intervient pour maintenir l'intégrité du génome lors de nombreuses perturbations cellulaires. Chez l'homme 50% des tumeurs sont associées à des mutations du gène *p53* et la moitié des personnes héritant d'une copie mutée de ce gène développe des tumeurs avant 30 ans (Hollstein et al., 1991). L'activation de la protéine P53 conduit à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire dont elle régule le passage entre les phases G1->S et G2->M ou à l'apoptose (Harris et al., 2005).

La protéine P53 est constituée de quatre domaines ; le domaine N-terminal essentiel à l'activation transcriptionnelle, un domaine central de liaison à l'ADN (Acide Desoxyribo Nucléique) qui reconnaît une séquence palindromique de 10 pb sur les régions promotrices de nombreux gènes régulés par cette protéine, un domaine de tétramérisation et un domaine C-terminal qui régule la liaison de P53 à l'ADN. La protéine P53 est active en tétramère et son oligomérisation est essentielle dans sa fonction de facteur de transcription. Les modifications post-traductionnelles de P53 comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination ou la sumoylation influencent sa stabilité, sa localisation cellulaire et sa fonction. Sur le plan biochimique, la protéine P53 est un facteur de transcription. On estime aujourd'hui que P53 peut réguler la transcription de plus de 200 gènes qui codent pour des protéines qui interviennent dans de nombreux processus vitaux pour la cellule comme la régulation du cycle cellulaire ainsi que la réparation de l'ADN ou les voies apoptotiques.

Régulation

P53 induit la transcription de son propre régulateur *mdm2* (**M**ouse **D**ouble **M**inute **2**) (Brooks et al., 2006). La protéine MDM2 codant pour une protéine E3 ligase se lie au domaine d'activation de la protéine P53 dans sa partie N-terminal pour masquer son domaine de transactivation et bloquer l'accès aux facteurs de transcription. MDM2 peut également promouvoir la dégradation de la protéine P53 en induisant la liaison d'une ubiquitine sur la partie C-terminal de P53. Ceci provoque un changement de conformation de P53 et permet l'accès aux facteurs d'export du noyau. Une fois ubiquitinée, P53 est transloquée dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome. De la même manière que MDM2, P53 est également régulée par d'autres protéines comme COP1 (**C**onstitutively **P**hotomorphogenic **1**), PIRH2 (**P**53-**I**nduced protein with a **R**ING-**H**2 domain), MULE/ARF-BP1 (**M**CL-1 **U**biquitin **L**igase **E**3/**ARF**-**B**inding **P**rotein **1**). Ces gènes transcrits par P53 codent également pour des protéines E3 ligases qui vont induire la dégradation de P53 par ubiquitination (**Fig. 7**).

Activation

En réponse à de nombreux stress (ADN endommagé, perturbation du fuseau mitotique, activation d'oncogènes, infection virale, agents alkylants, hypoxie ou manque de facteurs de croissance), la protéine P53 est rapidement activée. Lors de son activation, P53 est phosphorylée sur plusieurs de ces résidus. Certaines phosphorylations empêchent la liaison de MDM2 et ces autres régulateurs, les autres favorisent la liaison avec des facteurs de transcription. Une fois phosphorylée, la protéine P53 est stabilisée et s'accumule dans le noyau. Une fois activée la protéine P53 induit la transcription de nombreux gènes. Cette

activation peut avoir pour effet un arrêt du cycle cellulaire en G1 ou en G2, la mort de la cellule par apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence, l'angiogenèse ou la différenciation de la cellule (Aylon et al., 2007) (**Fig. 7**). La protéine P53 peut également être activée par une autre voie indépendante. En réponse à une stimulation par des oncogènes, la cellule active le facteur de transcription MYC (v-myc Myelocytomatosis viral oncogene homolog) qui va induire la transcription du gène *e2f* lui-même codant pour un facteur de transcription. La protéine E2F à son tour active la transcription du gène *p14(ARF)* qui code pour une protéine qui va inactiver la protéine MDM2 par sumoylation et provoquer sa dégradation. Ceci provoque une augmentation de P53 dans le noyau et son activation (**Fig. 7**).

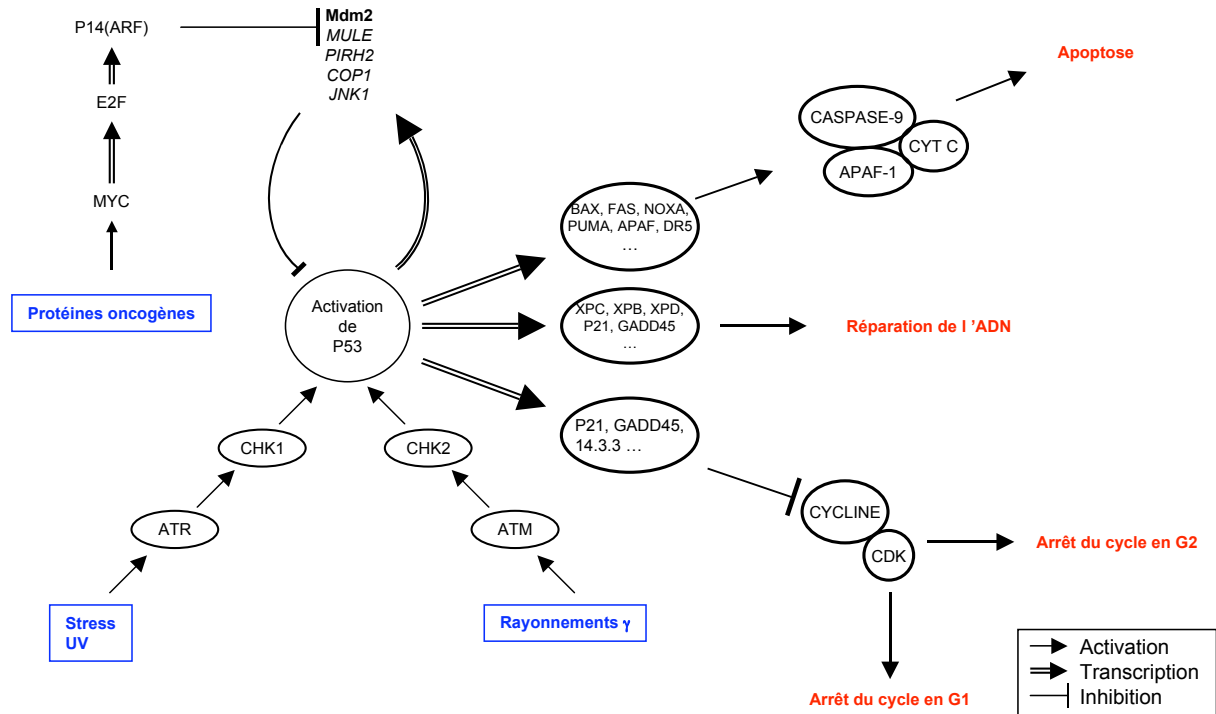


Figure 7 : Activation et régulation de la protéine P53.

La protéine P53 est régulée par de nombreuses protéines dont elle induit elle-même la transcription. La protéine P53 est activée par de nombreux signaux de stress ou suite à des lésions à l'ADN (en bleu). Suivant le type de signal transféré à P53, les modifications post-traductionnelles seront différentes et la réponse induite spécifique (en rouge).

Donc P53 n'est pas activé directement par les signaux extracellulaires, plusieurs protéines se chargent de percevoir ces signaux et de les transmettre à P53 par des voies intracellulaires. Ces signaux activent P53 par modifications post-traductionnelles, protègent P53 de sa dégradation par ces régulateurs et augmentent sa concentration intranucléaire. Les différents agents qui activent P53 induisent des voies intracellulaires différentes et des réponses différentes. Par exemple, une exposition aux UV induit une phosphorylation sur le résidu Sérine 392 alors que des radiations vont induire des phosphorylations sur les résidus Sérine 15 et Sérine 20. Ceci permet une réponse spécifique et appropriée au stimulus.

Le cycle cellulaire

Suite à des lésions de l'ADN, la protéine P53 activée, peut induire la transcription de nombreux gènes qui peuvent bloquer le cycle cellulaire et induire les mécanismes de réparation de l'ADN. Les gènes *p21/waf1/cip1* (Wild Type p53-Activated Fragment 1/Cdk2

Inhibiting Protein 1), *gadd45* (**G**rowth **A**rrest **D**N**A**-**D**amage **45**) et *14-3-3 σ* qui sont transcrits par P53 peuvent induire l'arrêt des cellules en G1 ou en G2 (Taylor et al., 2001).

L'apoptose

Suite à des modifications post-traductionnelles, le facteur de transcription P53 peut également transactiver des gènes codants pour des protéines impliquées dans le processus de l'apoptose comme les récepteurs de mort (FAS1/APO1 et KILLER/DR5), les membres pro-apoptotiques de la famille BCL-2 (BAX, PUMA, NOXA, BID) ou les éléments clés de l'apoptose (APAF-1, CASPASE-6 et 10) (Miyashita et al., 1994). La protéine P53 régule également l'apoptose en inhibant l'expression de membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 comme BCL-2 (**B**-**C**ell **L**ymphoma **2**), BCL-xL (**B**-**C**ell **L**eukemia **xL**) et des inhibiteurs de l'apoptose comme SURVIVIN (Sugars et al., 2001) (Hoffman et al., 2002). La protéine P53 régule également des protéines cytoplasmiques comme SCOTIN, une protéine du Réticulum Endoplasmique (RE) qui pourrait jouer un rôle dans l'apoptose via la dérégulation du calcium et PTEN (**P**hosphatase and **T**ENsin homolog), un inhibiteur de la voie PI3K/AKT qui inhibe l'apoptose en réponse à des facteurs de croissance et de survie (Li et al., 2007).

La réparation de l'ADN

La protéine P53 activée suite à des dommages à l'ADN induit la réparation de l'ADN en activant des protéines comme P53R2, XPE/P48, XPC, XPB/ERCC3, XPD/ERCC2, WRN ou PCNA. Le gène *pcna* (**P**rolifération **C**ell **N**uclear **A**ntigen) code pour une protéine nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN. Les protéines P21 et GADD45 activées par P53 se lient à PCNA, l'inactivent et bloquent la réplication pour induire la réparation de l'ADN. P53 peut elle-même réparer certains dommages à l'ADN comme la résolution des jonctions de Holliday et certaines coupures double brins (Gatz et al., 2006)

La protéine P53 possède aussi des fonctions pro-apoptotiques indépendantes de sa fonction transcriptionnelle. Elle pourrait relocaliser des récepteurs de mort à la surface des cellules ; elle aurait aussi un rôle direct sur les mitochondries ou elle pourrait réparer les excisions de bases de l'ADN mitochondriale, réguler la transcription de gènes par liaison directe avec l'extrémité 5' non transcrite des ARNm ou se lier à BCL-2 et BCL-xL pour les inactiver (de Souza-Pinto et al., 2004) (Mihara et al., 2003).

Cette présentation de la protéine P53 n'est pas exhaustive. Je n'ai abordé qu'une petite partie des possibilités d'action de cette protéine qui sont connues des scientifiques. On peut rappeler que dans 50% des tumeurs, cette protéine est mutée et les études pour essayer de restaurer l'activité de cette protéine afin de soigner les cancers sont nombreuses et les découvertes à venir certainement très importantes (Levine et al., 2006). Au début de l'année 2007, deux groupes ont publié les premiers effets *in vivo* de la restauration de la fonction de la protéine P53, cette restauration mène à la régression et à la sénescence des tumeurs dans la souris (Ventura et al., 2007).

Les facteurs épigénétiques

A cette instabilité génomique, s'ajoutent les modifications épigénétiques qui sont transmises des cellules mères aux cellules filles. Ces modifications épigénétiques n'affectent pas directement la séquence nucléique, mais peuvent en changer le fonctionnement et la dynamique en altérant l'expression des gènes. Elles influencent la conformation de la

chromatine, l'activité transcriptionnelle, mais aussi la dynamique de réplication. Ces modifications épigénétiques vont permettre la régulation des gènes en modulant la méthylation des régions CpG ou l'acétylation et la méthylation des histones. Ces deux paramètres participent à la structure générale de la chromatine permettant une accessibilité ou non à la transcription des gènes (Esteller et al., 2006). Dans les cellules cancéreuses, deux phénomènes coexistent, une hyper-méthylation qui va inhiber la transcription de certains gènes suppresseurs de tumeurs comme p16 INK4a, BRCA1, PTEN, P53 et l'hypo-méthylation, plus associée à l'instabilité génomique, qui va activer la transcription de certains oncogènes (Miremadi et al., 2007). L'Azacitidine (5-Aza-C) et la Decitabine (5-aza-2' deoxycytidine) sont deux drogues qui sont utilisées pour restaurer la transcription de gènes inhibés par une hyperméthylation. Leur fonctionnement réside dans l'inhibition des enzymes qui méthylent les résidus cytosines dans les régions CpG des promoteurs de ces gènes (Stresemann et al., 2006). D'autres modifications épigénétiques comme un défaut de l'ubiquitination, de la SUMOylation et de la phosphorylation peuvent également avoir un rôle dans la transformation de la cellule.

Récemment, il a été publié que les microRNAs (miRNAs) qui régulent 30% des gènes au niveau post-transcriptionnel dans l'organisme auraient également un rôle majeur dans le développement des cancers (Lewis et al., 2005) (Hwang et al., 2006). Les miRNAs sont des petits ARNs de 18 à 24bp qui ont été découverts dans les années 90 chez *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Schématiquement, chez l'homme, des miRNAs précurseurs sont transcrits dans le noyau de la cellule. Ils sont ensuite découpés en miRNAs sous forme d'épingles à cheveux par la protéine DROSHA. Ces miRNAs sont ensuite expulsés du noyau par la protéine EXPORTIN-5, dans le cytoplasme où ils sont clivés par la protéine DICER. Une fois matures, les miRNA viennent se fixer sur les régions 3'UTR des gènes qu'ils régulent. Le complexe miRNP (micro-ribonucleoprotien)/RISC (**R**na **I**nduced **S**ilencing **C**omplex) vient alors s'intégrer au miRNA pour bloquer la transcription des gènes sur lesquels ils sont fixés. Les miRNAs règlent l'expression génique en s'appariant avec des ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation sur la partie 3'UTR bloque la traduction de la protéine correspondante ou clive l'ARNm cible au milieu du site de fixation du miRNA. Aujourd'hui plus de 300 miRNAs ont été identifiés chez l'homme et les spécialistes estiment qu'il en existerait plus d'un millier. Le groupe de Croce a montré en 2002 que les leucémie lymphocytaires chroniques (CLL) étaient souvent associées à la perte des miRNAs miR-15a et miR-16-1 localisés sur le Chr. 13q14. Plusieurs groupes ont également observé que dans différents cancers comme les cancers du sein, les cancers du côlon, les cancers des poumons..., il y avait une diminution de l'expression des miRNAs.

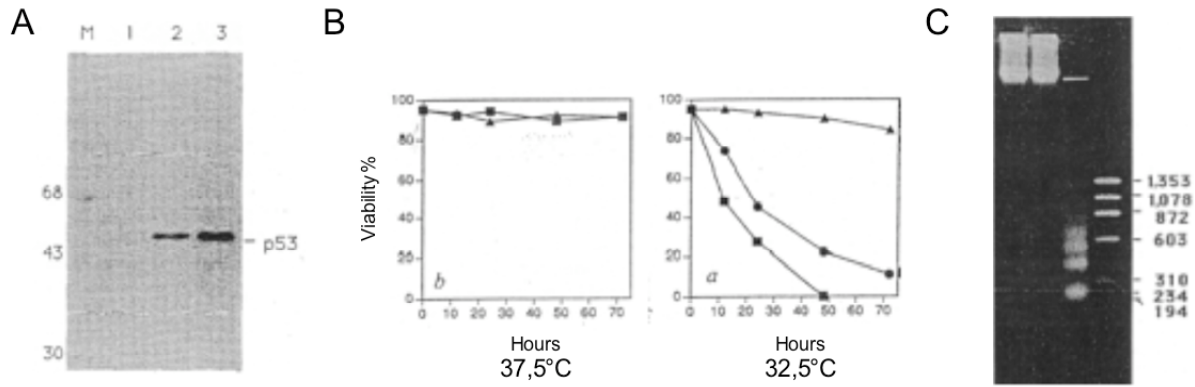
Il existe deux types de miRNAs : ceux qui vont être surexprimés dans les cellules tumorales et qui vont avoir un rôle anti-apoptotique et pro-prolifératif et ceux sous exprimés dans les cellules tumorales qui vont plutôt agir comme des anti-prolifératifs et des pro-apoptotiques. Dans la première catégorie, le cluster miR-17 regroupant 6 miRNAs et localisé sur le Chr.13q31 correspondant à une région qui est amplifiée dans de nombreux lymphomes et tumeurs solides, se retrouve surexprimé dans ces lymphomes. La surexpression d'une forme tronquée de miR-17 dans des cellules souches hématopoïétiques induit une mort rapide des cellules. Deux miRNAs, miR-17-5p et miR-20 régulent positivement l'expression du facteur de transcription E2F1. L'inhibition de miR-21 dans des cellules glioblastomes par l'utilisation d'un inhibiteur de fonction des miRNAs, le 2'-O-methyl antisense oligonucléotide induit l'activation des caspases et l'apoptose. Dans la seconde catégorie, le miRNA let-7 très conservé entre les espèces, lie l'oncogène RAS. L'expression de let-7 dans des cellules de

cancer du poumon induit l'arrêt de la croissance cellulaire *in vitro*. Les miRNAs : miR-15a et miR-16-1 ont également une action sur la suppression de l'activité tumorale. Ils se lient dans la région 3'UTR de BCL-2 une protéine anti-apoptotique. La surexpression de miR-15a et miR-16-1 induit la diminution de l'expression de BCL-2 dans une lignée cellulaire de leucémie et induit la mort cellulaire par apoptose. Inversement, la délétion de miR-15a et miR-16-1, induit l'augmentation de l'expression de BCL-2 et la survie des B-CLL. Voici brièvement une étendue des mécanismes mis en jeu dans le processus de la cancérisation de la cellule. Une cellule se transforme en cellule cancéreuse par le biais de facteurs génétiques, de facteurs épigénétiques ou suite à une régulation post-transcriptionnelle.

La suppression du phénotype malin par complémentation

Lors d'expériences de fusion entre des cellules tumorales et des cellules normales, Harris et Miller ont montré que l'apport chromosomique des cellules normales permettait la suppression du phénotype malin dans les cellules hybrides (Harris et al., 1969). Les cellules hybrides poussant sur milieu sélectif se sont avérées très peu tumorigènes en comparaison aux cellules parentales tumorales. D'autres expériences de fusion cellulaire ont ensuite montré que le phénotype malin d'une cellule tumorale pouvait être supprimé (Sager et al., 1985). Ces expériences ont confirmé la théorie de Knudson, l'apport d'une copie conforme d'un gène muté par une cellule normale permettait de rétablir la fonction du gène dans la cellule hybride (Stanbridge et al., 1976). Par la suite, des chercheurs ont montré que l'introduction d'un seul chromosome dans des cellules tumorales permettait également d'induire une suppression du phénotype tumoral (Seitz et al., 2005). Enfin, le transfert et la réexpression d'un gène dans une cellule tumorale a permis d'atténuer le phénotype malin de ces cellules (Grodin et al., 1995) (Chen et al., 1996). La suppression du phénotype malin correspond donc à une complémentation d'ADN. Par diverses méthodes comme la fusion cellulaire ou le transfert de chromosomes ou de gènes, le matériel génétique de la cellule est restauré et son phénotype tumoral atténué. Ces nombreuses expériences de complémentation ont permis de caractériser les gènes suppresseurs de tumeurs. Inversement l'inhibition des oncogènes en utilisant des antisenses spécifiques dans des cellules tumorales permet également à ces cellules de retrouver un phénotype moins tumorigène (Dandekar et al., 2004).

Un des modèles de suppression de phénotype malin par complémentation d'ADN est le modèle M1/LTR6 décrit par l'équipe de Moshe Oren. Les cellules M1 (myeloid leukaemia cells) sont des cellules cancéreuses de souris qui n'expriment pas de protéine P53 et les cellules LTR6 sont des cellules M1 stablement transfectées avec un gène *p53* muté codant pour une protéine P53 thermosensible, le résidu Alanine 135 de la protéine P53 étant remplacé par une Valine. Lorsque les cellules sont cultivées à 37,5°C, la protéine P53 est inactive et quand les cellules sont cultivées à 32,5°C, la protéine adopte une conformation qui lui permet d'avoir une activité normale de facteur de transcription et de gène suppresseur de tumeur (Yonish-Rouach et al., 1991). Cette activation induit l'apoptose dans les cellules LTR6 (**Fig. 8**).



(D'après Yonish-Rouarch et al., 1991)

Figure 8 : Caractérisation des clones transfectés par la protéine P53 thermosensible.

A : Détection de la protéine P53 dans les cellules M1 (ligne 1) et les cellules M1 transfectées par P53Val135 (lignes 2 et 3). **B :** Contrôle de la mort cellulaire des cellules M1 (▲) et M1 transfectées par P53Val135 (■ et ●) cultivées à 32,5°C pendant plusieurs heures (contrôle à 37,5°C). **C :** DNA fragmentation des cellules M1 (ligne 1) et M1 transfectées par P53Val135 (ligne 2 et 3) cultivées à 37,5°C (ligne 2) et à 32,5°C (ligne 1 et 3).

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la voie P53, notre équipe a utilisé ce modèle cellulaire contenant une protéine P53 activable. Par analyse différentielle, dix gènes dont l'expression est différemment exprimée entre les cellules à 32°C et celles qui sont maintenues à 37°C ont été identifiés (Amson et al., 1996). Parmi ces dix gènes, huit sont surexprimés suite à l'activation de la protéine P53 à 32°C, ils sont nommés *TSAP* (Tumor Suppressor Activated Pathway), les deux autres sont inhibés à 32°C et sont nommés *TSIP* (Tumor Suppressor Inhibited Pathway) (**Fig. 9**).

Les gènes *tsap* participeraient potentiellement à la suppression du phénotype tumoral. À l'inverse, les gènes *tsip* favoriseraient le phénotype tumoral. Parmi les gènes identifiés, les gènes *tsap1*, *tsap2* et *tsap3* présentent respectivement des homologies avec les gènes *phospholipase C β4* (PLC β4), *zfm1/sf1* (human **Z**inc **F**inger **M**otif **1**/Splicing **F**actor **1**) et *siah* (**S**even **I**n **A**bsentia **H**omologue) déjà identifiés chez d'autres espèces (Kim et al., 1993) (Toda et al., 1994) (Carthew et al., 1990).

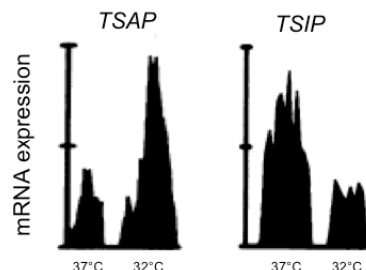
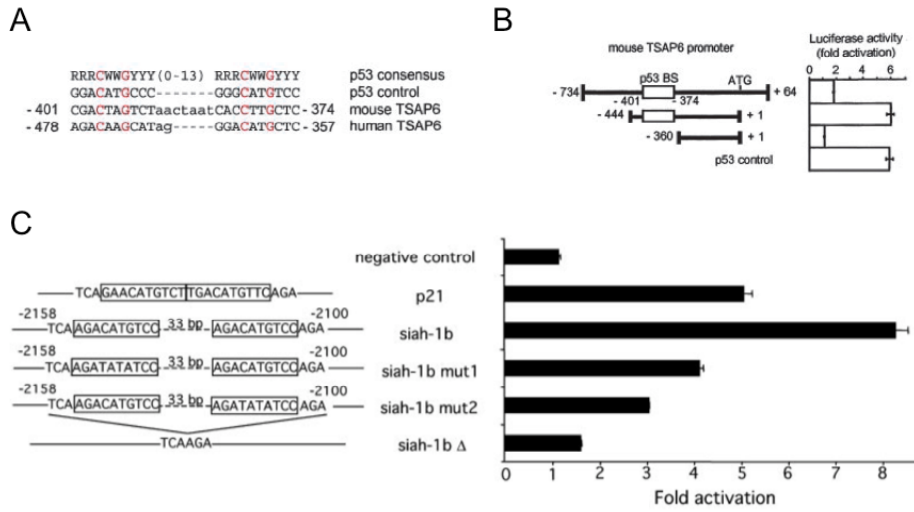


Figure 9 : Représentation schématique des TSAP et des TSIP dans le système M1/LTR6.

Par la suite, notre équipe a identifié un site de liaison pour la protéine P53 sur les régions promotrices des gènes *siah1b* (*tsap3*) et *tsap6* permettant de conclure que la protéine P53

induit directement la transcription de ces deux gènes (Fiucci et al., 2004) (Passer et al., 2003) (*Annexe 2*) (*Annexe 3*) (**Fig. 10**).



(D'après Passer et al., 2003 et Fiucci et al., 2003)

Figure 10 : la protéine P53 régule directement la transcription des gènes *siah1b* et *tsap6*.

A : site de liaison pour la protéine P53 sur le promoteur de *TSAP6*. **B** : expérience de luciférase montrant la régulation du gène *tsap6* par la protéine P53. **C** : site consensus sur le promoteur de *siah1b* pour la protéine P53 et activité de la luciférase.

3 - LA REVERSION TUMORALE

On vient de voir comment une cellule devient cancéreuse suite à une exposition à des facteurs cancérogènes. Une cellule intègre des mutations génétiques sur plusieurs gènes qu'elle va transmettre à ces cellules filles. Ce transfert n'est possible que si les gènes qui régulent la réparation de l'ADN, la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose sont mutés. Les tumeurs se développent à partir de ces cellules anormales transformées. Il a été montré que certaines cellules tumorales parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué. Ce phénomène est la « réversion tumorale ». La réversion tumorale n'implique à priori pas de changement dans la séquence nucléique et ce terme est employé pour désigner la réapparition d'un phénotype moins malin au sein de cellules tumorales (Pollack et al., 1968).

Une cellule normale arrête de proliférer quand elle est en contact avec les cellules voisines, ou quand elle n'est plus sur un support. Une cellule tumorale pousse de façon anarchique, en contact les unes des autres, elles continuent à pousser formant des multi-couches de cellules. De plus ces cellules cancéreuses sont capables de pousser sans support ou en « soft agar ». Lors de la réversion tumorale, les cellules révertantes retrouvent les caractéristiques de croissance des cellules normales et ce sont ces deux principaux critères qui vont permettre de distinguer les cellules tumorales et les cellules révertantes.

La découverte de cellules redevenues sensibles à l'inhibition de contact dans une population de cellules de souris NIH3T3 infectées par le virus oncogène SV40 (**S**arcoma **V**irus **40**) a ouvert la voie de la réversion tumorale. Les cellules NIH3T3 sont des cellules normales qui sont isolées à partir de fibroblastes embryonnaires de souris et contrairement à d'autres lignées cellulaires, elles ont gardé certaines caractéristiques des cellules normales comme l'inhibition de contact. Lorsque ces cellules arrivent à confluence, elles entrent en phase G1 et arrêtent leur prolifération. Lorsque ces cellules sont infectées et transformées par le virus oncogène SV40, elles acquièrent des caractéristiques de cellules tumorales comme la perte d'inhibition de contact et poussent anarchiquement. En 1968, Pollack et Green ont isolé à partir de ces cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène SV40, des clones ayant retrouvé spontanément les caractéristiques des cellules NIH3T3 non-transformées. Pour sélectionner les clones révertants, ils ont utilisé la drogue FuDR (**F**Uorouridine-**D**esoxy**R**ibose) sur les cellules à confluences. La drogue FudR est cytotoxique pour les cellules lors de la synthèse de l'ADN en phase S. A confluence, les cellules transformées continuent à proliférer et sont éliminées par la drogue alors que les clones révertants qui ont arrêté leur prolifération survivent. Ces clones ont une morphologie légèrement différente des autres cellules, ils sont plus plats et plus adhérents en culture. Ces clones ont également une capacité réduite à former des tumeurs chez le hamster. Ils ont été nommés « Flat Revertants » en raison de leur morphologie. Il a également été montré que ce n'était pas la perte du virus qui expliquait la perte de tumorigénicité de ces clones révertants (Macpherson et al., 1971).

Plusieurs travaux ont permis ensuite d'isoler et de caractériser d'autres révertants à partir de cellules tumorales selon différentes techniques de caractérisation : leur morphologie en culture, leur incapacité à pousser sans ancrage (en matrigel), leur perte de pouvoir tumorigène après injection dans des animaux immunodéficients ou leur baisse de sensibilité à des agents cytotoxiques comme la drogue FudR. Les travaux de Pollack et Green ont été confirmés avec d'autres cellules et d'autres virus à ADN (le polyoma virus) ou à ARN (le virus du sarcome

de Rous, le virus du sarcome murin de Kristen) (Rabinowitz et al., 1968) (Noda et al., 1983). Ces études ont également montré qu'il était impossible de ré-infecter des révertants avec le même virus ayant servi à la première transformation. Mais il a été mis en évidence que ces clones pouvaient être sensibles à l'infection par un autre virus (Vogel et al., 1974) (Stephenson et al., 1973). Les clones révertants ont donc quelques caractéristiques qui les distinguent des cellules tumorales dont ils sont issus. Ils résistent au virus si on les réinfecte avec le même virus, ils ne poussent pas en Soft-Agar car ils ont perdu leur indépendance d'ancrage et ils sont beaucoup moins tumorigènes quand on les injecte dans des animaux. Mais cette réversion tumorale ne s'accompagne pas d'une différenciation ; en effet leur morphologie diffère peu des cellules tumorales parentales et l'analyse de certains marqueurs de différenciation n'a pas révélé de différence d'expression entre les deux types de cellules.

Afin d'identifier les mécanismes enclenchés lors du processus de réversion tumorale, Adam Telerman et Robert Amson ont choisi de travailler avec des cellules tumorales possédant déjà de nombreuses mutations et caractéristiques des cancers dont sont issues ces cellules. Pour isoler des clones révertants à partir de cellules tumorales, ils ont utilisé le Parvovirus-H1 qui a la propriété de détruire les cellules cancéreuses et d'épargner les cellules normales (Van Pachterbeke et al., 1993).

Le Parvovirus-H1 comme agent de sélection

Ce virus de la famille des Parvoviridae est un virus autonome non enveloppé à ADN linéaire simple brin. Son cycle lytique dépend de l'état de différenciation et de prolifération de la cellule hôte. Le Parvovirus-H1 est un virus qui a la propriété d'être oncolytique vis-à-vis des cellules tumorales et il est capable d'inhiber la formation de tumeurs chez les animaux de laboratoire (Rommelaere et al., 1991). Le Parvovirus-H1 se réplique dans le noyau des cellules infectées, mais ne s'intègre pas à leur génome. La réplication de l'ADN simple brin viral s'effectue au cours de la phase S sous le contrôle de la machinerie de la cellule hôte. Dans ces expériences, le Parvovirus-H1 est utilisé comme un agent de sélection des cellules ayant perdu de leur tumorigénicité (**Fig. 11**).

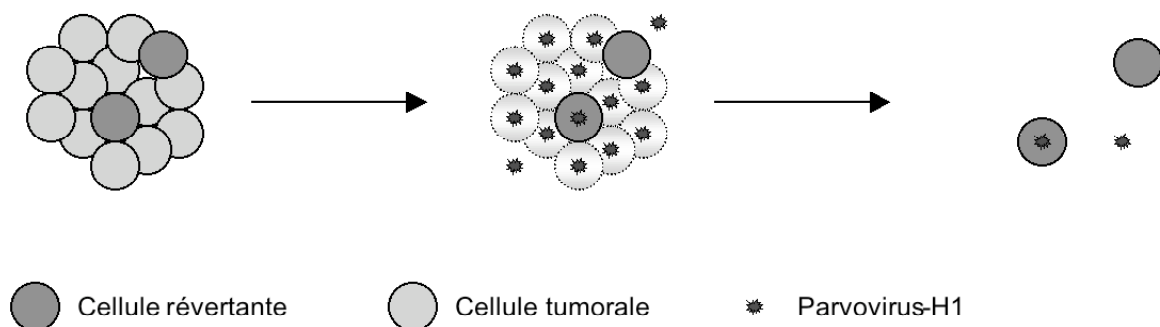
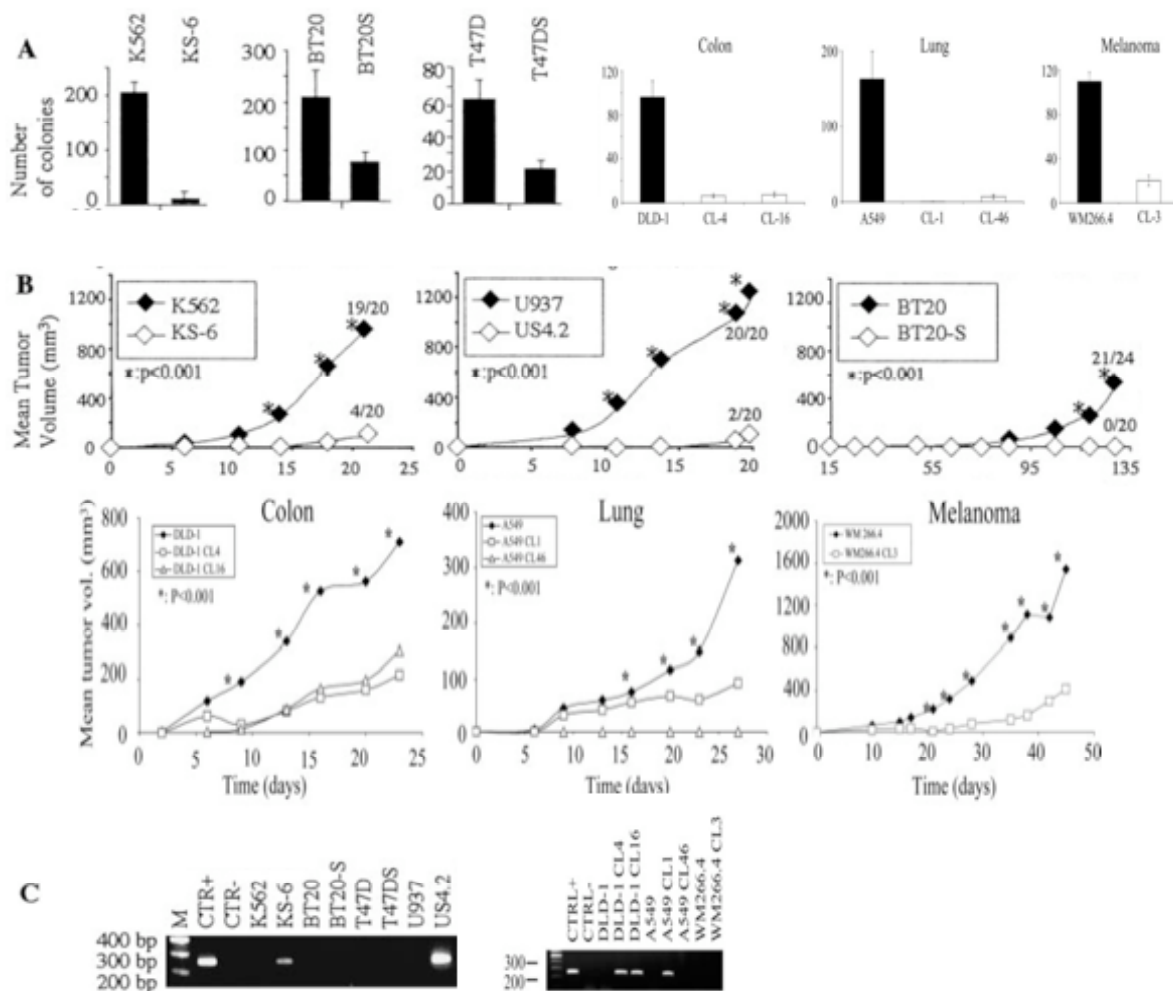


Figure 11 : Isolation de cellules révertantes.

Une lignée cellulaire contenant des cellules tumorales et quelques cellules révertantes sont infectées par le parvovirus-H1. Les cellules tumorales infectées sont lysées alors que les cellules tumorales résistent à l'infection.

Des modèles à partir de lignées cellulaires tumorales

Les premiers modèles de révertants obtenus à partir de cellules tumorales furent obtenus dans une lignée cellulaire de leucémie érythrocytaire (K562) (Telerman et al., 1993). L'infection par le Parvovirus-H1 a abouti à une mort cellulaire massive. Après quelques semaines de maintien en culture, quelques cellules résistantes à l'effet cytotoxique du virus, environ 1 cellule sur 1 million, ont émergé. Parmi ces cellules résistantes, le clone KS a présenté un phénotype tumoral atténué. Ensuite deux autres clones révertants US3 et US4 ont été obtenus suite à l'infection d'une lignée cellulaire de leucémie (U937) par le Parvovirus-H1 (Nemani et al., 1996). Ces clones US3 et US4 n'induisent quasiment pas de tumeurs quand ils sont injectés à des souris immunodéficientes *scid-scid* en comparaison aux cellules parentales U937. Leur phénotype tumorigène est significativement atténué. Le criblage de 18 antigènes de surface n'a montré aucune différence entre les clones révertants KS, US3 et US4 et les cellules parentales K562 et U937 ; ces clones ne se sont donc pas différenciés (**Fig. 12**).



(D'après Tuynder et al., 2002 et Tuynder et al., 2004)

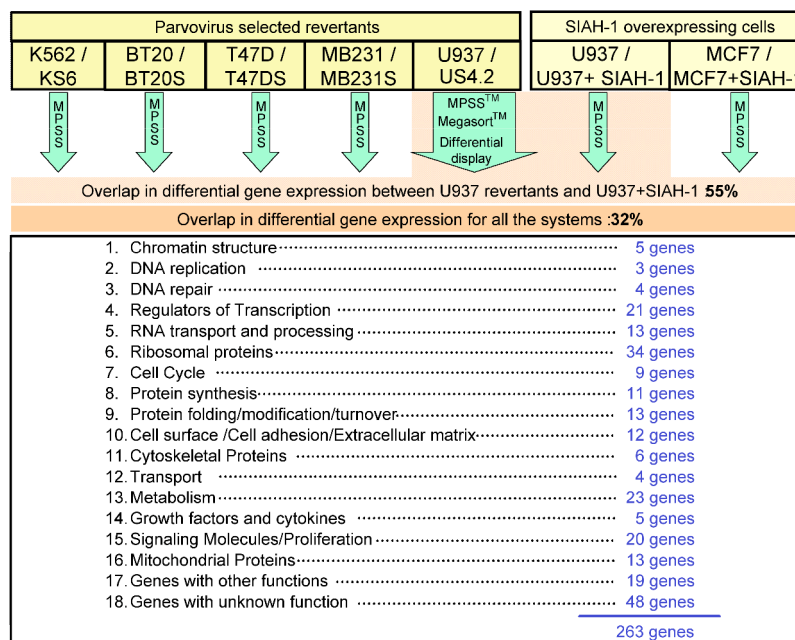
Figure 12 : Caractérisation des clones révertants.

A : culture en soft-agar ; calcul du nombre de cellules. **B** : tumorigénicité *in vivo* ; mesure du volume de la tumeur après injection de cellules dans des souris *scid/scid*. **C** : Analyse par PCR pour détecter la présence de Parvovirus-H1 dans les cellules.

Pour compléter les modèles de révertants, de nouveaux modèles ont été développés à partir de lignées cellulaires issues de tumeurs solides d'adénocarcinome colorectal (DLD-1), de carcinome de poumon (A549) et de mélanomes (WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28 et Hs852T) (Tuynder et al., 2004). Tous ces révertants possèdent des caractéristiques de cellules normales ; ils ne poussent pas en matrigel car ils ont perdu leur indépendance d'ancrage, ils n'induisent pas de tumeurs dans des souris immunodéficientes et certains présentent une augmentation de l'apoptose en comparaison aux lignées parentales d'origine. On peut noter que cette apoptose est indépendante de P53 puisque dans ce type de lignées cellulaires tumorales la protéine P53 est mutée. Certains de ces clones révertants produisent le Parvovirus-H1 et l'on ne peut pas exclure que le virus aide à l'apparition de cellules révertantes. Mais on a noté dans les nouveaux modèles de révertants issus de lignées cellulaires T47D, BT20 et MDA-MB231 provenant de tumeurs solides de cancer du sein que certains clones ne contenaient plus le Parvovirus-H1 mais avaient tout de même les caractéristiques de révertants (Tuynder et al., 2002) (**Fig. 12**).

4 - GENES IMPLIQUES DANS LA REVERSION TUMORALE

Pour identifier les gènes jouant un rôle dans la réversion tumorale, plusieurs méthodes de screening différentiel sur ces modèles cellulaires spécifiques ont été effectuées par Megasort et MPSS (Massively Parallel Signature Sequencing) en collaboration avec Lynx ainsi que par cDNA Différentiel Display (Brenner and Williams et al., 2000) (Brenner and Johnson et al., 2000). L'expression des gènes les plus significativement régulés lors de la réversion tumorale a été confirmé par Northern-Blot et PCR-Quantitative (Tuynder et al., 2002). Deux cent soixante-trois gènes ont été identifiés pour être activés ou inhibés durant ce processus dans le système U937/US4 et 32% de ces gènes sont différentiellement exprimés dans les sept modèles analysés (**Fig. 13**) (*Annexe 1*).



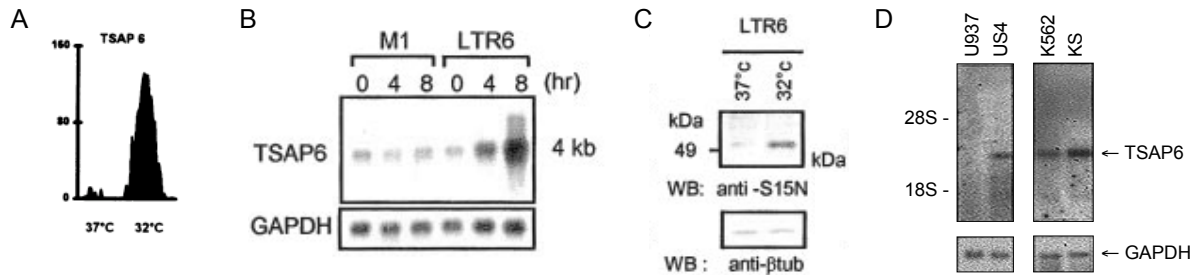
(D'après Tuynder et al., 2002)

Figure 13 : Classification des gènes régulés lors du processus de la réversion tumorale.

La plupart des processus vitaux de la cellule sont impliqués dans la réversion tumorale, plusieurs gènes participent à la structure de la chromatine, à la réplication et la réparation de l'ADN ou encore à la régulation de la transcription, de la traduction et du cycle cellulaire ... Il ne s'agit donc pas seulement d'un arrêt de la prolifération ou d'une augmentation de l'apoptose, c'est l'ensemble des processus vitaux de la cellule qui sont modifiés dans la réversion tumorale.

Parmi les *TSIP* et les *TSAP*, nous nous sommes intéressés à deux gènes en particulier, le gène *tsap6* dont l'expression est activée durant le processus de la réversion tumorale et le gène *tpt1* dont l'expression est réduite durant ce même processus.

Le gène *tsap6* (Tumor Suppressor Activated Pathway 6) a été découvert par notre équipe lors de l'identification de gènes impliqués dans le mécanisme de l'apoptose en utilisant le modèle cellulaire M1/LTR6 contenant une protéine P53 thermosensible (Amson et al., 1996). La transcription de ce gène est induite suite à l'activation de l'apoptose dans ces cellules due à l'activation de P53. L'expression de ce gène est également activée dans les modèles cellulaires K562/KS et U937/US4 (Passer et al., 2003) (**Fig. 14**).

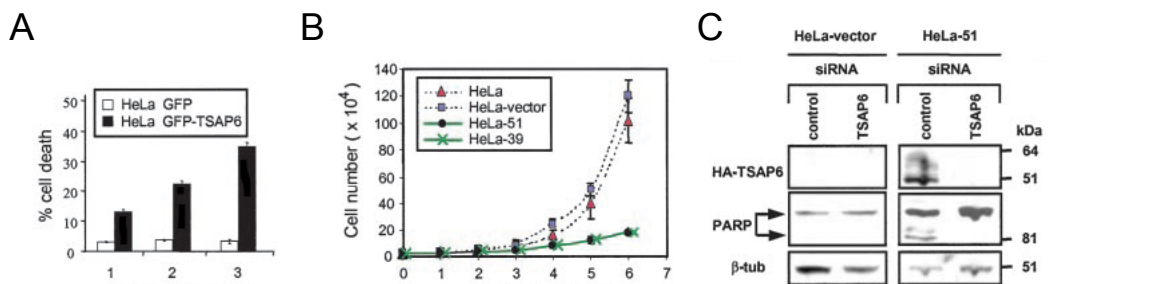


(D'après Amson et al., 1996 et Passer et al., 2003)

Figure 14 : Identification et régulation de TSAP6 dans les différents modèles

A : quantification différentielle de l'expression de l'ARNm de TSAP6 par le β Imager 1200. **B et C** : analyse par Northern-Blot (**B**) et Western-Blot (**C**) de l'expression de TSAP6 dans le modèle LTR6 après culture des cellules à 32°C. **D** : analyse par Northern-Blot de l'expression de TSAP6 dans des modèles révertants.

TSAP6 est une protéine pro-apoptotique, elle est nécessaire à l'induction de l'apoptose dans les cellules LTR6. L'utilisation d'antisense contre TSAP6 dans les LTR6 inhibe la réponse apoptotique induite par l'activation de la protéine P53. La surexpression de TSAP6 dans les cellules Hela induit une mort des cellules par apoptose (**Fig. 15**). L'effet apoptotique de TSAP6 est inhibé par l'utilisation d'un siRNA.



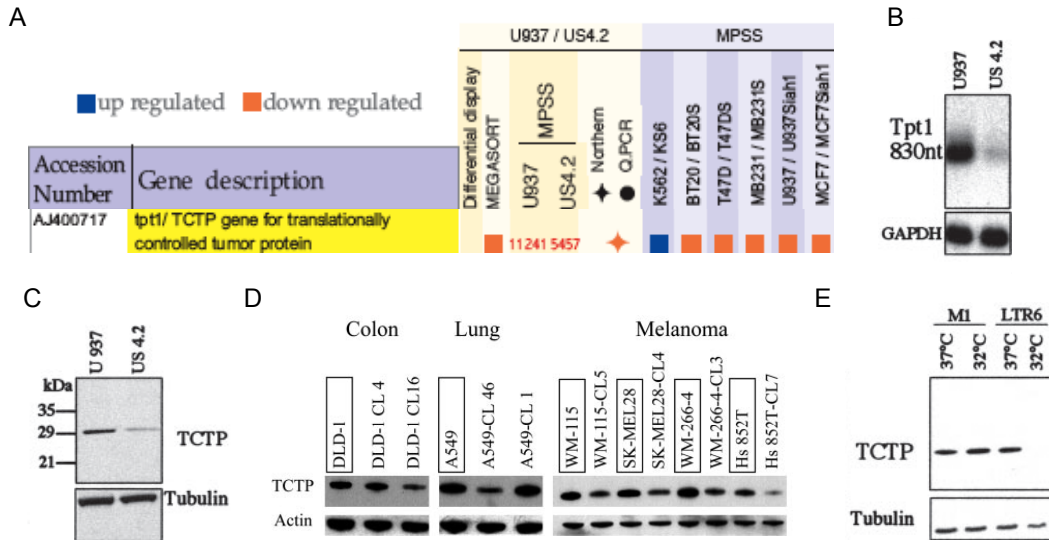
(D'après Passer et al., 2003)

Figure 15 : TSAP6 est une protéine pro-apoptotique.

A : la surexpression de TSAP6 dans des cellules Hela induit la mort cellulaire, **B** : une inhibition de la croissance cellulaire, **C** : et le clivage de la PARP.

Le gène *tsap6* code pour une protéine transmembranaire également appelé pHyde et Dudulin-2 par d'autres groupes de recherche pour enfin être nommé STEAP3 pour son homologie de structure et de fonction avec les autres protéines de la famille STEAP.

Le gène *tpt1* (tumor protein, translationally-controlled 1) a été mis en évidence par notre équipe pour être fortement régulé lors des mécanismes de réversion tumorale dans de nombreux modèles. Il est cent fois plus exprimé dans des cellules cancéreuses en comparaison aux cellules révertantes moins tumorigènes à l'exception du système K562/KS6 (Tuynder et al., 2002) (Tuynder et al., 2004) (**Fig. 16**). Dans les cellules LTR6 où l'on induit l'apoptose en activant la protéine P53, l'expression de *tpt1* est également réduite.



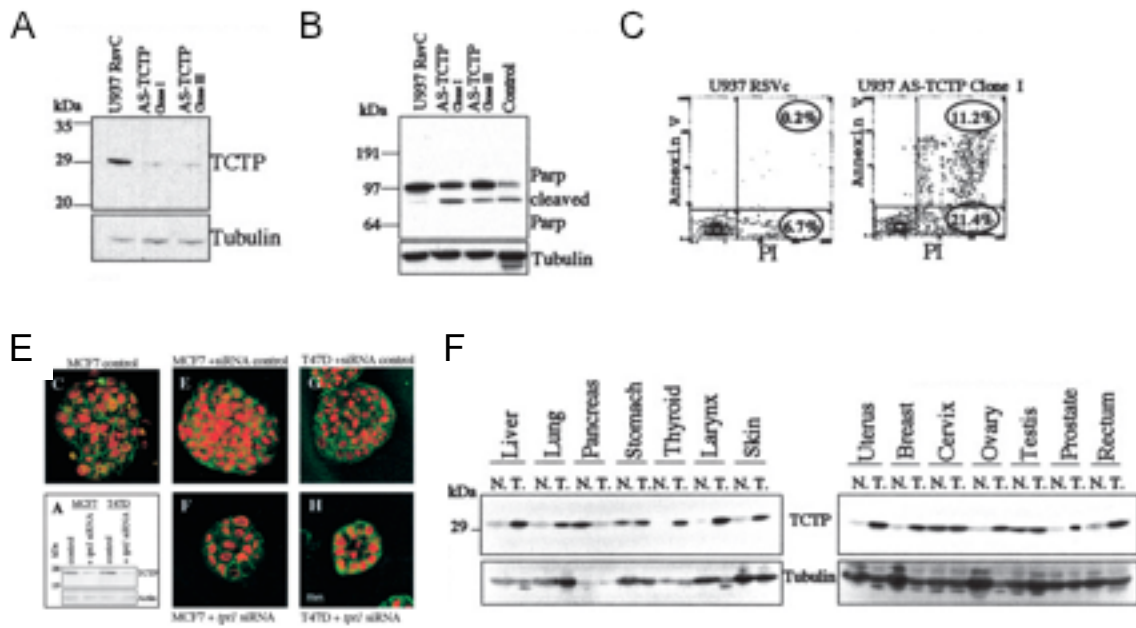
(D'après Tuynder et al., 2002 et Tuynder et al., 2004)

Figure 16 : Identification et régulation de TCTP dans les différents modèles.

A : quantification différentielle de l'expression de TCTP dans les modèles révertants par MPSS, Megasort et Northern-Blot. **B et C** : analyse par Northern-Blot (**B**) et Western-Blot (**C**) de l'expression de TCTP dans le modèle U937/US. **D** : analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP dans les autres modèles issus de tumeurs solides. **E** : analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP dans les cellules LTR6 en culture à 32°C.

TCTP est une protéine anti-apoptotique. L'inhibition de *tpt1* par antisense ou siRNA dans la lignée cellulaire tumorale U937 induit une augmentation de l'apoptose (**Fig. 17**). Les cellules tumorales U937 exprimant moins de TCTP sont également moins tumorigènes lorsqu'elles sont injectées à des souris *scid/scid*.

L'inhibition de *tpt1* par siRNA dans deux lignées cellulaires tumorales MCF-7 et T47D induit un changement du phénotype de ces cellules ; en matrigel les cellules exprimant moins de TCTP poussent de façon organisée comme des cellules normales, elles ont retrouvé un phénotype moins tumorale (**Fig. 17**). L'expression de TCTP dans les tissus issus de tumeurs est beaucoup plus élevée comparé à son expression dans les tissus sains.



(D'après Tuynder et al., 2002)

Figure 17 : Caractérisation de TCTP une protéine anti-apoptotique.

A et B : analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP (**A**) et du clivage de la PARP (**B**) dans les U937 transfectées par un antisense TCTP. **C :** analyse de l'apoptose par Cytométrie de flux par marquage à l'Annexine V. **D :** perte de tumorigénicité des cellules tumorales exprimant moins de TCTP par culture en Soft Agar. **E :** analyse par Western-Blot du profil d'expression de TCTP dans des tissus sains (N) et cancéreux (T).

Le gène *tpt1* code pour la protéine TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein), protéine abondante dans les cellules tumorales et moins abondante dans les tissus sains. *Tpt1* agit comme un gène qui favorise le phénotype tumoral et bloque l'apoptose. La possibilité de baisser le niveau d'expression de cette protéine dans des cellules tumorales pourrait être une nouvelle thérapie anti-cancéreuse.

TSAP6

TSAP6 appartient à la famille STEAP (Six-Transmembrane Epithelial Antigene) regroupant actuellement quatre protéines : STEAP1 (appelé également STEAP), STEAP2 (également appelé STAMP-1), STEAP3/TSAP6 (appelé également pHyde ou Dudulin-2) et STEAP4 (appelé également STAMP-2 ou TIARP). Ces quatre protéines ont des séquences homologues, des structures secondaires similaires et une localisation membranaire voisine dans la cellule. Depuis peu, une fonction commune à ces 4 protéines a été proposée.

Caractérisation structurale et cellulaire des STEAPs

Les protéines de la famille STEAP sont des protéines à six domaines transmembranaires (TM) ; la région la plus conservée entre les protéines et les espèces correspond aux TM dans la partie centrale des protéines de cette famille (Fig. 18).

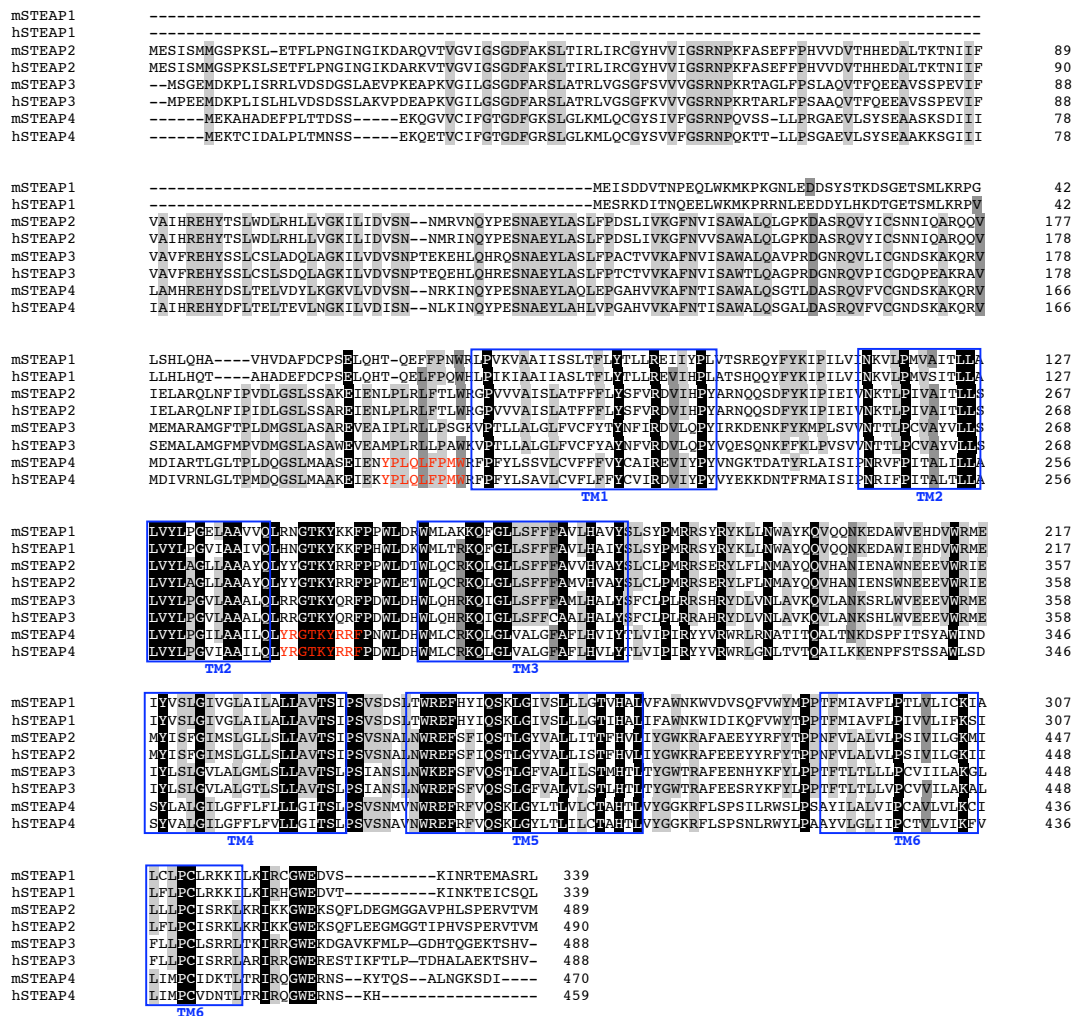


Figure 18 : Alignements et domaines TMs des protéines de la famille STEAP.

Alignements des quatre membres de la famille STEAP chez l'homme (hSTEAP) et chez la souris (mSTEAP). **A** : 100% d'homologie, **A** : 87,5% d'homologie, **A** : 75% d'homologie. Domaine Transmembranaire (TM) sont obtenues par consensus de cinq programmes de prédictions (TMHMM, SVMTM, HMMTOP, MEMSAT, DAS). En rouge sont indiqués les peptides ressemblants aux motifs présents sur les ligands de la Caveolin et permettant leur liaison.

On peut signaler que selon les programmes utilisés, le nombre de domaines TMs peut varier de cinq à sept TMs. Par exemple pour la protéine TSAP6, trois programmes sur cinq utilisés prédisent même un septième domaine TM en amont du premier TM.

Tous les gènes de la famille STEAP sont localisés sur des segments de synténie conservée entre le génome humain et le génome de la souris. Les gènes *steap1*, *steap2* et *steap4* sont localisés sur le Chr. 5 chez la souris (Chr. 5A1) et sur le Chr. 7 chez l'homme (Chr. 7q21 proche du télomère) (Hubert et al., 1999) (Yang et al., 2001). Chez l'homme, le Chr. 7 a été mis en évidence pour avoir un lien dans les cancers de la prostate et leurs agressivités de tumorigénicité. Il s'agirait d'amplification chromosomique ; le nombre de copies du chromosome 7 est plus important chez les patients atteints de cancers de la prostate (Alcaraz et al., 1994). À la différence des autres membres, le gène *tsap6* est localisé chez la souris sur le Chr. 1 (Chr. 1E2) et chez l'homme sur le Chr. 2 (Chr. 2q14).

L'utilisation de programmes informatiques prédit des motifs sur les protéines de la famille STEAP (à l'exception de la protéine STEAP1), comparant celles-ci à des protéines impliquées dans les voies d'endocytose et/ou d'exocytose entre la membrane plasmique et la face Trans du Golgi ou Trans-Golgi-Network (TGN) (Teasdale et al., 1996) (**Fig. 19**).

mSTEAP1	-----	
mSTEAP2	MESISMMGSPKSL-ETFLPNGINGIKDARQVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCG YHVV IGS	59
mSTEAP3	--MSGEM DKPLI SRRLVDSGSLAEVPEKAPKVGILGSGDFARSLATRLVSGFSSVVVGS	58
mSTEAP4	-----MEKAHA DEFPL TTDSS-----EKQGVVCFVGTGDFGKSLGLKMLQCG YSIV FGS	49
mSTEAP1	-----	
mSTEAP2	RNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNIIFVAIHREH YTSLWDLRHL LVGKILIDVSN--	117
mSTEAP3	RNPKRTAGLFPPLAQVTFQEEAVSSPEVIFVAVFREH YSSL CSLADQLAGKILVDVSNPT	118
mSTEAP4	RNPQVSS-LLPRGAEVLSYSEAASKSDIIILAMHREH YDSL TELVDYLKGVLDVSN--	106
mSTEAP1	-----MEISDDVTNPEQLWKMKPKGNLEDDSYSTKDSG ETSML KRPG	42
mSTEAP2	NMRVNQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGFNVISAWALQGPKASRQVYICSNNIQARQOV	177
mSTEAP3	EKEHL QHRQSNAEYLASLFPACTVVKAFNVISAWALQAVPRDGNRQVLCGNDSKAKQRV	178
mSTEAP4	NRKINQYPESNAEYL LAOLE PGAHVVKAFNTISAWALQSGTLASRQVFVCGNDSKAKQRV	166
mSTEAP1	LSHLQHA----VHDAFDCPSELQHT-QEFPFNWR LPVKVAAI ISSLTFLYTLREIYYP	97
mSTEAP2	IELARQLNFIPV DLGSL SSAKE EIENL PLRLFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHP	237
mSTEAP3	MEMARAMGFTPL DMGSL ASARE EVEAI PLRLLPSGKVPTLLALGLFVCFYTYNFIRDVLQP	238
mSTEAP4	MDIARTLGLTPL DQGSL MAASEIENYPLQLFPMWR FPFYLSSVLCVFFFVYCAIREVIYYP	226

TM1

Figure 19 : Prédications de motifs sur les protéines de la famille STEAP.

[D/E]xxx[L/I]: signals TGN-endosome sorting. **Yxx[F/I/M/L/V]**: signals TGN-endosome sorting, plasma membrane exocytosis **Lxx[L/M]E**: signals protein export from ER. Utilisation du programme de prédiction : [Locate](#) : [subcellular localisation database](#)

Des résultats expérimentaux montrent bien que les protéines de la famille STEAP sont des protéines membranaires localisées principalement à la membrane plasmique et que trois d'entre elles se retrouvent également au niveau du TGN ou au niveau de vésicules de sécrétion comme les endosomes.

Par immunohistochimie sur tissus ou sur une lignée cellulaire 293T, STEAP1 est localisée à la membrane plasmique avec les extrémités N-terminal et C-terminal orientées vers le cytoplasme. Au niveau des tissus, on constate que la protéine est localisée préférentiellement à la jonction des cellules épithéliales (Hubert et al., 1999).

La construction GFP-STEAP2 est localisée au niveau de la membrane plasmique et du Golgi et plus particulièrement au TGN dans les cellules COS-1, LNCap et DU145. Cette construction colocalise également avec la protéine EEA1 (Early Endosome Antigen 1) un marqueur des endosomes précoces (Korkmaz et al., 2002) (Porkka et al., 2002). Des expériences de photobleaching montrent que GFP-STEAP2 traverse rapidement les différentes parties du Golgi. La localisation de STEAP2 au TGN est inhibée par la Bréfeldine-A (BFA).

Dans des conditions de surexpression, des analyses d'immunohistochimie sur des coupes de tumeurs montrent que la construction adénovirus-pHyd est localisée à la fois au niveau du noyau et dans le cytoplasme (Zhang et al., 2001). D'autres expériences d'immunofluorescences montrent que chez l'homme, la protéine endogène TSAP6 est localisée au niveau de la membrane plasmique et autour du noyau dans trois types de lignées cellulaires 293T, HepG2 et Hela (Amzallag et al., 2004). Ces mêmes expériences montrent également que la protéine TSAP6 colocalise avec la protéine TCTP dans ces cellules.

La construction GFP-STEAP4 comme GFP-STEAP2 est localisée au niveau du Golgi et au niveau de la membrane plasmique dans la lignée cellulaire COS-1. Sur des cellules vivantes, cette construction suit une trajectoire dans le cytosol du Golgi vers la membrane plasmique au niveau de structures de transport vésiculo-tubulaire. Ce type de structures participe à l'acheminement de vésicules aux organites par des modes de transport d'endocytose et d'exocytose. Cette construction GFP-STEAP4, colocalise avec EEA1, le marqueur des endosomes précoces et est aussi détectée au niveau du RE, organites nécessaires pour le folding et la distribution des protéines (Korkmaz et al., 2005). STEAP4 endogène est localisée à la jonction des cellules et dans des petites vésicules correspondant à des invaginations de la membrane plasmique. Au cours de la différenciation des cellules pré-adipocytes (3T3-L1), il y a une accumulation de STEAP4 au niveau de la membrane plasmique et au niveau du Golgi (Moldes et al., 2001). D'autres études montrent que les protéines STEAP4 et CAVEOLIN-1 colocalisent dans la lignée cellulaire 3T3-L1 après maintien de la confluence des cellules pendant 8 jours. La protéine STEAP4 contient deux motifs [YPLQLFPMW] et [YRGTKYRRF] présents de part et d'autres des TM1 et TM2 qui sont similaires aux motifs présents chez les ligands de la CAVEOLIN-1 et nécessaires à leurs interactions (Chambaut-Guérin et al., 2005). La CAVEOLIN-1 est un des composants essentiels des cavéoles ; c'est une protéine de 21-22 kDa, organisée en épingle à cheveux, formant des oligomères et capable de lier le cholestérol (Rothberg et al., 1992). Les cavéoles présentent dans les cellules endothéliales et absentes dans les lymphocytes et les neuroblastes, sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre décrites pour la première fois dans les années 1950 par George Palade. Il a été montré que les cavéoles jouent un rôle important dans les voies de signalisation, elles seraient responsables d'un ciblage des molécules vers le Golgi et le RE. Cette endocytose ne serait pas constitutive, certaines bactéries ou certains virus déclencheraient l'invagination des cavéoles (Thomsen et al., 2002). La protéine STEAP4 pourrait être impliquée dans le trafic extracellulaire entre les cellules adipocytaires du fait de sa localisation au niveau de leurs jonctions et dans les cavéoles.

Les protéines de la famille STEAP sont donc des protéines membranaires, elles ont une homologie de séquence et une localisation cellulaire similaire. À l'exception de la protéine STEAP1, les autres protéines sont localisées en partie au niveau du Golgi. Le Golgi joue un rôle important dans la voie de sécrétion classique, après le RE, il est le second organite nécessaire à la sortie des protéines et des lipides. Ces prédictions et les données expérimentales de localisation au niveau de vésicules et du Golgi laisse envisager que les membres de la famille STEAP (à l'exception de STEAP1) puissent être impliqués dans des mécanismes de sécrétion et/ou d'endocytose.

Homologie structurale des STEAPs avec d'autres protéines

En plus des homologies avec les membres de la famille STEAP chez les métazoaires, les protéines de cette famille présentent également des similitudes avec des motifs de protéines du groupe des bactéries, des archéobactéries et des levures qui pourraient nous éclaircir sur le rôle de ces protéines dans la cellule. Les protéines de la famille STEAP à l'exception de la protéine STEAP1 présentent une homologie de séquence dans leurs parties N-terminal avec des protéines F420H2 : NADP⁺ oxydoréductase. Ces protéines ont la capacité de fixer des coenzymes comme les FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et les NADP(H) (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) pour effectuer des réactions d'oxydations et/ou de réductions. La protéine STEAP1 est une protéine plus courte que tous les membres de cette famille dans sa partie N-terminal. Les protéines STEAPs présentent également une homologie dans leur partie transmembranaire avec des protéines de la famille YED-Z, NOX et FRE (Sanchez-Pulido et al., 2004) (Ohgami et al., 2005) (**Fig. 20**). Elles ont toutes en commun la capacité à fixer des dinucléotides comme NADP(H) et six domaines TMs avec la capacité de fixer une ou deux molécules d'hème entre ces domaines TMs. Ce motif a été nommé ACRATA (Apoptosis, Cancer and Redox Associated Transmembrane).

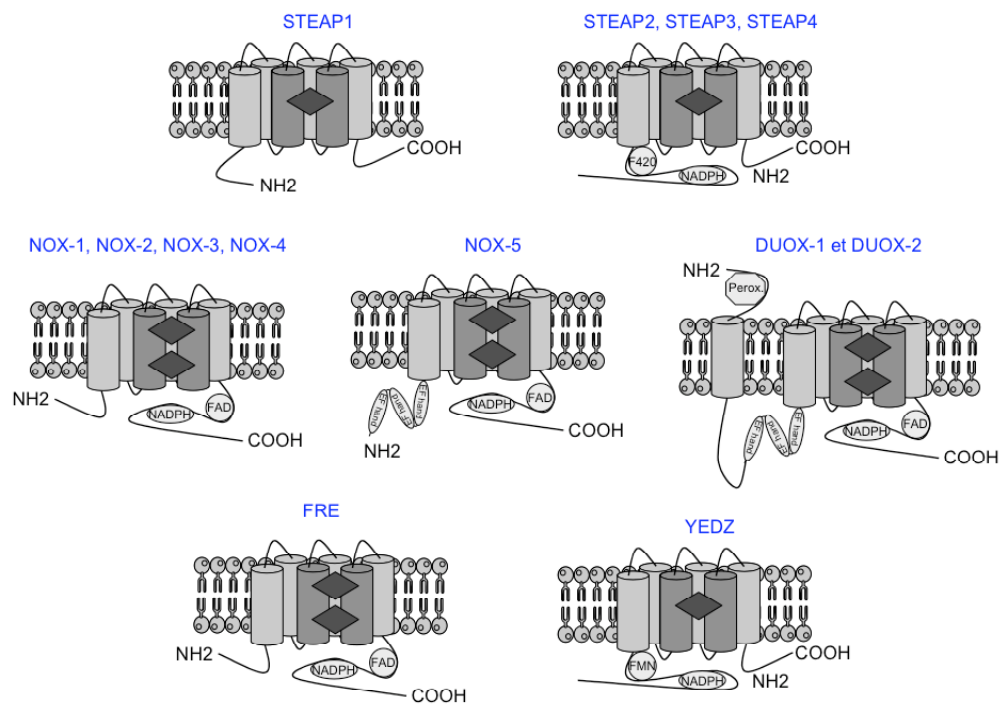


Figure 20 : Représentation schématique de la structures des protéines STEAP, YED-Z, NOX et FRE.

Les six domaines TMs sont représentés par des cylindres gris avec en gris foncé les domaines TM3 et TM5 permettant la liaison avec les molécules d'hèmes (losange).

La recherche d'homologie dans les séquences protéiques des protéines STEAP prédit dans leur partie N-terminal un motif homologue retrouvé dans les protéines oxydoréductases F420H2 :NADP⁺. Ces enzymes sont capables de réactions d'oxydoréduction. Ce motif conservé correspond en fait à un site de liaison pour les dinucléotides/coenzymes NADP(H) et les F420 qui sont des FAD(H) modifiées. Ces dinucléotides participent à de nombreuses réactions d'oxydation, de réduction et plus généralement de réactions de biosynthèses importantes. Ils agissent comme transporteurs d'hydrogène ou d'électrons pour l'enzyme sur

laquelle ils se fixent. Le cofacteur F420 est un 5'-deazaflavin analogue des FAD(H), présent chez les archéobactéries, les cyanobactéries mais absent de la plupart des bactéries, des plantes et des mammifères à l'exception des protéines de la famille STEAP (Warkentin et al., 2001).

Ce site de liaison des dinucléotides sur des protéines est plus généralement appelé domaine Rossmann fold (Rossmann et al., 1974). Il est composé d'une succession de feuilletts bêta (β) et d'hélices alpha (α) selon le schéma suivant $\beta\alpha\beta\alpha\beta$. Dans le cas d'un site de liaison aux coenzymes NAD(H) et NADP(H), il y a deux sites Rossmann fold à la suite. Cette structure $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, contient entre autres deux motifs caractéristiques et essentiels pour la fixation des dinucléotides que l'on retrouve chez les protéines de la famille STEAP. Le premier motif c'est le site : **GxGxx[G/A]** qui a un rôle essentiel dans la conformation de la protéine et la fixation du dinucléotide (**Fig. 21**). La mutation d'une seule des 2 Glycines (G) empêche la fixation des coenzymes et inhibe l'activité enzymatique de la protéine. Le deuxième motif du Rossmann fold c'est la conservation de 1 à 2 résidus Arginine (R) et Serine (S) en C-terminal du motif GxGxx[A/G] pour permettre la liaison du ribose de l'adénine du dinucléotide. Les protéines de la famille STEAP, à l'exception de STEAP1, contiennent toutes les caractéristiques pour fixer les dinucléotides ; elles sont donc vraisemblablement des enzymes.

	----- $\beta\beta\beta\beta\beta$ ----- $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha$ ----- $\beta\beta\beta\beta$ -----	
msF420H2/NADP	-----MKISIIG GTGSQGL NLNGKRFAIAGEDVVIIG SR KKEE	35
mSTEAP1	-----	
mSTEAP2	MESISMMGSPKSL-ETFLPNGINGIKDARQVTVGVI GSGDFA KSLTIRLIRCGYHVVI SR NPK	63
mSTEAP3	--MSGEMDKPLISRRLVDSGSLAEVPEAPKVGIL GSGDFA RSLATRLVSGFSVVV SR NPK	62
mSTEAP4	-----MEKAHADEFPLTTDSS-----EKQGVVCI GTGDFG KSLGLKMLQCGYSIVF SR NPQ	53

Figure 21 : Conservation du motif Rossmann fold.

GxGxx[A/G] : Motif Rossmann fold. **SR** : résidus Serine (S) et Arginine (R) indispensable pour que le ribose de l'adénine du dinucléotide NADP(H) se fixe. Prédiction des feuilletts β et des hélices α à l'aide des programmes de prédiction : MLRC, GOR4, SIMPA96, SOPMA, DSC et PHD. La séquence de l'oxydoréductase F420H2 NADP provient d'une bactérie : *Methanosphaera stadtmanae*.

La protéine YED-Z a été mise en évidence lors de la caractérisation de nouvelles protéines membranaires chez la bactérie *Escherichia coli* (Drew et al., 2002). Cette protéine à 6 domaines TMs a ces extrémités N-terminal et C-terminal orientées vers le cytoplasme (**Fig. 20**). La protéine YED-Z fonctionne en hétérodimère avec la protéine YED-Y et forme le complexe YED-YZ. Ces deux protéines appartiennent au même opéron et sont conservées dans la plupart des génomes des bactéries Gram-. YED-Y est une protéine soluble périplasmique qui contient le motif [S/T]RRxFLK nécessaire pour sa translocation au niveau de la membrane interne de la bactérie pour atteindre le périplasma. La protéine YED-Y contient un site pour le cofacteur MO-MPT (**M**Olybdenum **M**olybdo**P**Terin). YED-Y est la sous-unité catalytique de l'hétérodimère. Elle est capable de catalyser la réduction de S- et N-oxydés. YED-Z, la protéine membranaire du complexe YED-YZ, assure le transfert d'électron du cofacteur MO-MPT fixé sur la protéine YED-Y (Loschi et al., 2004). Elle agit comme une protéine oxydoréductase et est capable de fixer plusieurs cofacteurs comme le cytochrome b, l'hème ou la flavine FMN (**F**lavine **M**ono**N**ucléotide). On trouve beaucoup d'homologues de YED-Z dans les bactéries, y compris chez les magnétos et les cyanobactéries mais aussi chez les eucaryotes (Von Rozycki et al., 2004). La fonction de YED-Z reste mal connue à ce jour.

Les NOX (NADPH OXydases) sont des complexes enzymatiques qui s'assemblent dans les PMN (PolyMorphoNuclear leukocytes) sous l'effet d'une stimulation extracellulaire pour produire des ROS lors de l'explosion respiratoire. Les PMN sont des acteurs primordiaux dans la défense de l'organisme contre les éléments étrangers. La reconnaissance des bactéries par les PMN se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques qui tapissent la bactérie. Deux évènements destinés à éliminer la bactérie sont alors déclenchés. La membrane du polynucléaire s'invagine pour englober la particule indésirable, jusqu'à l'isoler complètement dans une vacuole par phagocytose. Les différents granules du phagocyte migrent et fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu enzymatique dans le phagosome. La seconde étape majeure dans l'activité bactéricide des phagocytes est l'explosion respiratoire, qui signe l'assemblage de la NADPH oxydase à la membrane de la vacuole et la production d'ions super-oxyde toxiques. Cette activation déclenche une réaction d'oxydoréduction qui débute tout d'abord au niveau du cytoplasme, puis à travers la membrane, pour finir à l'extérieur de la cellule pour libérer des ROS (**Fig. 22**). Dans le cas où cette libération de ROS est prolongée, cela peut induire des effets toxiques, notamment en dégradant les cellules et les tissus environnants.

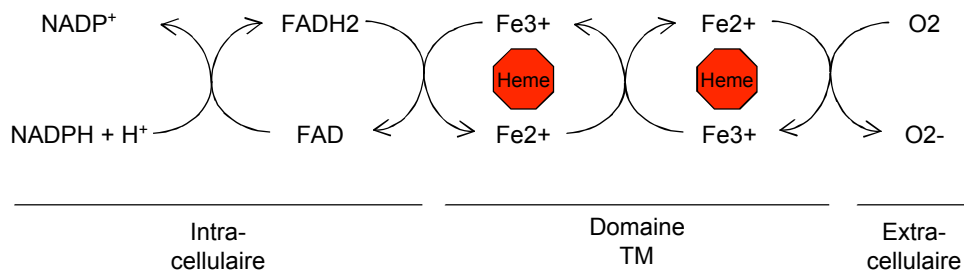


Figure 22 : Réaction d'oxydoréduction suite à l'activation de la protéine NOX-2.

L'électron du NADPH est transféré au FAD qui est réduit, puis au cytochrome B558 dont le fer ferrique (Fe^{3+}) du premier hème passe à l'état de fer ferreux (Fe^{2+}). De la même façon, le fer du second hème est réduit, puis les électrons réduisent l'accepteur final qui est l'oxygène moléculaire en ions super-oxydes (O_2^-). Les ions super-oxydes bactéricides produits sont instables et vont se dismuter en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) spontanément ou sous l'action de la super-oxyde dismutase (SOD). Il est ensuite dissocié en radical hydroxyle (OH^\cdot) et en ion hydroxyde (OH^-) par la réaction de Fenton.

Les cellules non-phagocytaires comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les ostéoclastes, les lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (LB-EBV) produisent aussi des ROS en réponse à des cytokines, des facteurs de croissance ou des hormones (Lambeth et al., 2002). Mais la production de ces radicaux oxygénés par ces cellules est extrêmement réduite comparée à ce que produisent les PMN. Les ROS ont d'abord été identifiés comme étant impliqués dans les mécanismes de défense avec l'identification de GP91^{phox} (NOX-2) dans les PMN (Geiszt et al., 2004). Puis des homologues de GP91^{phox} ont été identifiés (NOX-1, NOX-3, NOX-4, NOX-5 ou DUOX-1 et 2) dans d'autres tissus, clonés et classés en fonction de leurs homologies avec la protéine des PMN humains. Les études montrent que ces protéines sont aussi impliquées dans les voies de signalisation, le cancer, la croissance cellulaire, l'apoptose, la fonction des organes, l'angiogénèse et les modifications des protéines de la matrice extracellulaire (Brar et al., 2003). Chaque protéine NOX est une flavoprotéine ; elle possède six domaines TMs portant deux molécules d'hèmes et des sites de liaison pour les dinucléotides/coenzymes NADP(H) et les FAD. La protéine NOX-5 ainsi que les protéines DUOX (DUal-OXydase) possèdent en plus, une partie N-terminal plus longue avec des domaines EF-Hand intracellulaires (**Fig. 21**).

Ces domaines EF-Hands intracellulaires sont des domaines à motifs hélice-boucle-hélice qui permettent la liaison du calcium qui active ces protéines.

Le fer est essentiel pour les fonctions cellulaires. Il est le composant de plusieurs enzymes comme les cytochromes responsables de la respiration cellulaire ou les réductases de ribonucléotides agissant dans la synthèse d'ADN. À l'état naturel le fer se trouve principalement sous sa forme ferrique (Fe^{3+}). Cette forme est peu soluble dans des conditions physiologiques et se transforme en ferrique hydroxyde en présence d'oxygène et d' H_2O . La forme réduite du fer est le fer ferreux (Fe^{2+}) qui, lui, est beaucoup plus soluble mais beaucoup moins stable et se retrouve rapidement sous sa forme oxydée : Fe^{3+} . L'organisme a donc plusieurs problèmes pour pouvoir utiliser le fer. Le premier est la solubilité du fer, le second est le transport du fer de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et le dernier est la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} . La plupart des microorganismes utilisent de petites molécules appelées sidérophores pour transporter le Fe^{3+} dans la cellule via des transporteurs membranaires spécifiques. Le Fe^{3+} est ensuite réduit en Fe^{2+} à l'intérieur de la cellule (Neilands et al., 1981). Beaucoup d'eucaryotes comme *S. cerevisiae* ne synthétisent pas de sidérophores, mais transportent le Fe^{2+} à l'intérieur de la cellule après sa réduction par une réductase ferrique (Klausner et al., 1994). Les protéines FRE (**F**erri**R**eductase) sont des réductases ferriques qui ont été découvertes chez *S. cerevisiae* (Dancis et al., 1992). Homologues de la NADPH oxydase, GP91^{phox}, ces protéines transmembranaires sont responsables de la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} (Shatwell et al., 1996). Une mutation de FRE-1 ou sa délétion dans *S. cerevisiae* induit une diminution importante de l'activité réductase ferrique à la surface des cellules alors que le transport de Fe^{2+} n'est pas perturbé. Ces résultats montrent bien que la réductase ferrique n'agit pas sur le transport de Fe^{2+} dans la cellule. Pour l'instant aucune réductase ferrique n'a été identifiée comme étant capable d'assurer également le transfert de Fe^{2+} dans la cellule. Les protéines FRE sont également des réductases cuivriques qui réduisent le cuivre Cu^{2+} en Cu^{1+} et permettent son transport par la protéine CTR1P. La transcription des gènes *fre-1* et *fre-2* est régulée par des facteurs de transcription (AFT-1, AFT-2 ou MAC-1) sous l'influence de la concentration en fer et en cuivre (Rutherford et al., 2003). Les protéines de la famille STEAP ont donc des homologies avec les protéines F420H2 :NADP+ oxydoréductase, YED-Z, NOX et FRE qui sont elles-mêmes des flavocytochromes capables de fixer les cofacteurs NADP, FAD et l'hème et de catalyser leur énergie pour réaliser leurs activités d'oxydoréduction.

Conservation des Histidines (H)

Alors que les coenzymes NADPH et FAD se fixent sur la partie cytoplasmique des protéines par l'intermédiaire du domaine Rossmann fold, les molécules d'hèmes se fixent dans les domaines TMs par l'intermédiaire des résidus Histidine (H). Ces Histidines sont très conservées entre les quatre familles de protéines présentées précédemment mais aussi avec les protéines de la famille STEAP (**Fig. 23**). L'hème est constitué de quatre noyaux pyrroles autour d'un atome de fer divalent (Fe^{2+}). Chaque molécule d'hème se fixe à une sous-unité tétramère de la globine. La synthèse de l'hème est un processus complexe qui fait intervenir de nombreuses enzymes. Une partie de sa synthèse est réalisée dans la mitochondrie, les étapes intermédiaires ainsi que l'union à la globine se produisent dans le cytoplasme. Chez les mammifères, l'hème remplit trois fonctions essentielles ; il transporte l'oxygène, les électrons et il constitue le groupe prosthétique de certaines enzymes.

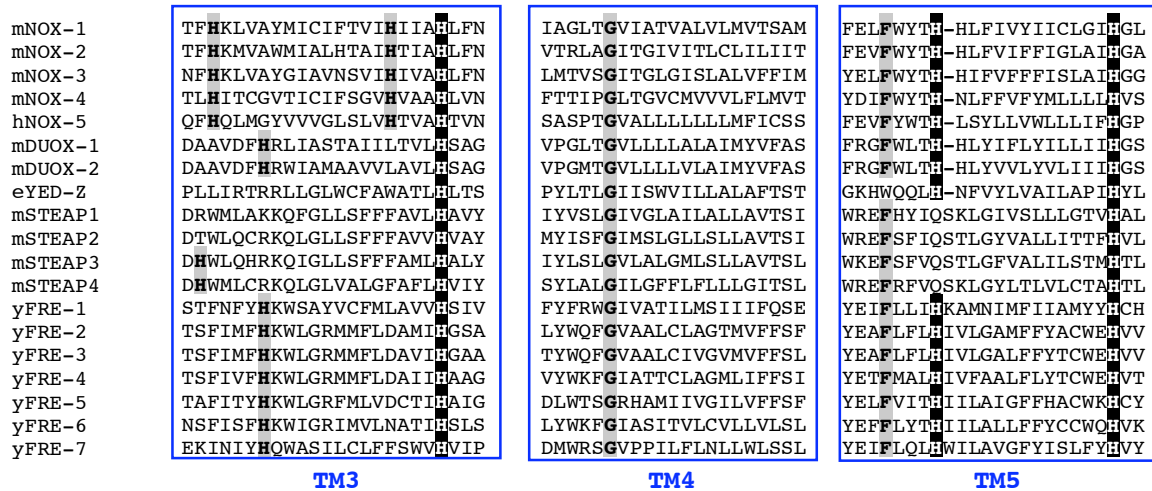


Figure 23 : Alignement des domaines TMs 3, 4 et 5.

X et **X** : Les histidines qui sont conservées et/ou impliquées dans la liaison de l'hème ainsi que les résidus très conservés entre les protéines des quatre familles. L'espèce de chaque protéine est indiquée en minuscule juste devant son nom ; m(Mus Musculus), y(Yeast), h(Homo Sapiens), e(Escherichia coli).

Afin que 2 molécules d'hème se fixent au niveau de chaque domaine TM un espacement de 12 à 14 résidus entre les résidus Histidines de chaque TM est nécessaire (Fig. 24).

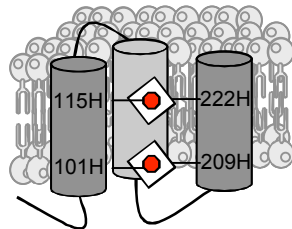


Figure 24 : Modèle structural de la liaison des molécules d'hèmes sur la protéine GP91^{phox}.

Le fer contenu dans les molécules d'hème est indiqué par un hexagone rouge.

Des expériences de mutation chez les protéines FRE et NOX ont montré que l'hème est indispensable à l'activité catalytique de ces protéines, une mutation des Histidines responsables de la liaison de l'hème inhibe l'activité oxydoréductase de la protéine (Biberstine-Kinkade et al., 2001). Comme YED-Z, les protéines STEAP ne fixeraient qu'une seule molécule d'hème avec un seul Histidine sur chaque TM. Alors que STEAP1 n'a pas de site de liaison pour des coenzymes NADPH et F420, elle contient tout de même les deux Histidines sur les domaines TM3 et TM5 pour permettre la liaison d'une molécule d'hème. STEAP1 serait plutôt une protéine cytochrome alors que les 3 autres membres de cette famille sont des flavocytochromes. Comme toutes les protéines qui fixent les dinucléotides, les protéines STEAP doivent être au centre de réactions importantes de production, de stockage et de transfert d'énergie. L'homologie de séquence, la structure transmembranaire, la localisation cellulaire, le site de liaison aux F420 dépendant de NADP(H) et la conservation des Histidines dans les séquences protéiques des protéines STEAP laissent envisager que ces protéines pourraient avoir une fonction enzymatique.

Les STEAPs : des métalloreductase ?

Comme nous le verrons par la suite, il a été montré que la protéine TSAP6 pourrait avoir une fonction de ferric-réductase (Oghami et al., 2005). Grâce à leurs homologies, les mêmes auteurs ont testé cette fonction sur les autres protéines de la famille STEAP. Il s'avérerait qu'à l'exception de la protéine STEAP1, les protéines STEAP2, TSAP6 et STEAP4 auraient une fonction de ferric-réductase mais également de cupric-réductase. Les auteurs parlent de métallo-réductases (Oghami et al., 2006).

Avant de mettre en évidence cette homologie avec des protéines ayant une activité enzymatique, les protéines STEAP ont été étudiées dans bien d'autres domaines et plus particulièrement pour leur régulation dans le cancer de la prostate pour les uns ou leur caractéristique de gène suppresseur de tumeur pour les autres. Certaines de ces protéines pourraient également avoir un rôle dans la régulation des voies de sécrétion.

Les protéines de la famille STEAP**La protéine STEAP1 ou STEAP**

Identifier tout d'abord chez l'homme par SSH dans des xénogreffes issues de métastases de cancer de la prostate, le gène *steap1*, est spécifique de la prostate et son niveau de transcription augmente dans les tissus issus de tumeurs (Hubert et al., 1999) (Yang et al., 2001). Mais *steap1* est également surexprimé dans des lignées cellulaires tumorales d'origine différentes comme les carcinomes du sang, des ovaires, du côlon, de l'estomac, du sein ou du pancréas, les sarcomes Ewing ou les leucémies lymphocytaires (Rodeberg et al., 2005). Le gène *steap1* a également été mis en évidence par la même méthode SSH dans les souris TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate). Ces souris sont génétiquement transformées par l'antigène tumoral du SV40 dans la prostate sous l'influence du promoteur rPB (rat ProBasin). Dans les lignées cellulaires tumorales Tramp-C1 et Tramp-C2 d'origine prostatique dérivées de ce modèle murin, le gène *steap1* est fortement exprimé. Contrairement aux autres marqueurs membranaires de cancer de la prostate et au gène *steap4* ; le gène *steap1* n'est pas sensible à la stimulation par les androgènes et il est détecté dans les cellules contenant ou non des récepteurs aux androgènes. Le gène *steap1* a le même profil d'expression que d'autres marqueurs membranaires spécifiques du cancer de la prostate comme PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen) ou PSCA (Prostate Stem Cell Antigen). L'expression de ces gènes est liée à l'état de progression de la tumeur dans la prostate (Reiter et al., 1998) (Machlenkin et al., 2005). Le fait que l'expression de *steap1* est spécifique de la prostate mais plus spécifiquement des tissus cancéreux, que son niveau d'expression corrèle avec la progression des cancers et l'état d'avancement des cancers comme les métastases et que la protéine STEAP1 est une protéine membranaire exprimée à la surface des cellules et puisse être un transporteur, un récepteur ou un canal, laisse pressentir que ce gène pourrait avoir un rôle dans le développement des cancers comme cela a déjà été montré pour d'autres protéines.

Ces 3 propriétés font de STEAP1 une protéine idéale pour le développement de drogues ou d'anticorps monoclonaux dans des thérapies anticancéreuses. Elles pourraient permettre également d'aider au diagnostic des cancers. Trois peptides de STEAP1 [86-94], [262-270] et [292-300] sont capables d'induire une réponse immunitaire *in vitro* et/ou *in vivo* via les LTC, d'inhiber la croissance des cellules tumorales et de déclencher ainsi une réponse anti-tumorale des LTC (Rodeberg et al., 2005) (Machlenkin et al., 2005) (Alves et al., 2006). Un autre groupe a montré qu'une vaccination par l'ADN de STEAP1 dans la souris pouvait protéger celle-ci contre la progression de la tumeur (Garcia-Hernandez et al., 2007). Cette protection se

fait via l'augmentation du nombre de lymphocytes T CD8+, mais ils montrent également que les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle important dans cette protection. Finalement, deux peptides de STEAP1 [102-116] et [192-206] sont capables de stimuler *in vitro* une réponse anti-tumorale des LTH (Kobayashi et al., 2007). Tous ces outils pourraient être utilisés pour de nouvelles thérapies anticancéreuses contre les cancers de la prostate mais également contre tous les autres cancers qui expriment de façon différentielle la protéine STEAP1. Une combinaison des peptides stimulant les deux populations de lymphocytes T pourrait aussi être envisagé pour améliorer la réponse immunitaire.

La protéine STEAP2 ou STAMP-1

Le gène *steap2/stamp-1* (**S**ix **T**rAns**M**embrane protein of **P**rostate **1**) a été mis en évidence lors de l'identification de gènes différentiellement exprimés dans des cancers de la prostate (Korkmaz et al., 2000) (Porkka et al., 2001) (Korkmaz et al., 2002) (Porkka et al., 2002). Cette méthode d'hybridation soustractive (SSH) a déjà été utilisée pour identifier d'autres gènes comme *psca*, *steap1*, *trps-1* (**T**richo-**R**hino-**P**halangeal **S**yndromes-**1**) et *pca-3* (**P**rostate **C**ancer **A**ntigen-**3**) différentiellement exprimés dans les cancers de la prostate. Le gène *steap2* est transcrit majoritairement dans la prostate en comparaison à d'autres tissus, mais il n'est pas exprimé dans toutes les cellules de la prostate. Par exemple *steap2* n'est pas exprimé dans les cellules ne contenant pas de récepteur aux androgènes comme les cellules DU145, 22Rv1, NCI-H660 et PC3, mais il est exprimé dans les cellules LNCaP. Cette différence d'expression n'est pas due à un réarrangement du gène dans ces différentes cellules ni à une hyper-méthylation du promoteur. La transcription de *steap2* n'est pas stimulée par les androgènes R1881 et DiHydroTestosterone (DHT) à l'inverse d'autres marqueurs des cancers prostatiques comme NKX-3.1 ou PSA (**P**rostate-specific antigen). L'expression du gène *steap2* diminue lorsque les tumeurs deviennent indépendantes aux androgènes. Des analyses d'hybridation *in situ* d'ARNm montrent que *steap2* est spécifiquement exprimé dans les cellules épithéliales de prostate et que son niveau de transcription est 2 à 3 fois plus élevé dans les cellules épithéliales de prostate cancéreuse. Le niveau d'expression de *steap2* augmente également dans les fibroses pulmonaires idiopathiques. Son expression est augmentée dans 25% des cancers (Ferguson et al., 2005). L'expression élevée de *steap2* dans les cancers de la prostate peut impliquer que ce dernier ait un rôle dans le développement des cancers mais il n'y a pas de relation entre le stade du cancer et le niveau de *steap2* (Edwards et al., 2005). La protéine STEAP2 pourrait avoir une activité oncogénique. De plus sa localisation à la surface des cellules pourrait en faire également une bonne cible pour des immunothérapies.

La protéine STEAP4 ou TIARP ou STAMP-2

Le gène *tiarp/steap4* (**T**umor necrosis factor-alpha-**I**nduced **A**dipose-**R**elated **P**rotein) a été mis en évidence lors de l'identification de gènes différentiellement exprimés lors de la différenciation de cellules adipocytaires (3T3-L1) en réponse à une stimulation par le facteur TNF α (Moldes et al., 2001). Le gène *tiarp* est transcrit dans les tissus adipeux blancs et bruns mais pas seulement. Il est aussi exprimé dans le foie, les reins, le placenta, les poumons, la prostate, le cœur et les muscles squelettiques (Korkmaz et al., 2005) (Wellen et al., 2007). Il n'est pas exprimé dans les cellules ne contenant pas de récepteur aux androgènes comme les cellules (LNCaP) mais à la différence de *steap2*, la transcription de *steap4* est stimulée par l'androgène R1881. Une équipe a retrouvé un site très conservé ARE (**A**ndrogen **R**esponse **E**lements) dans la région promotrice de *steap4* (Dhanasekaran et al., 2004). Le gène *tiarp* est fortement exprimé *in vitro* et *in vivo* dans des cellules issues de cancers de la prostate, mais n'est pas détectable *in vitro* dans d'autres cancers comme des cellules du cancer des poumons, cancer du col de l'utérus ou cancer du sein. Enfin, la surexpression de la protéine STEAP4

dans des lignées cellulaires variées comme PC3, COS7 et DU145 induit la prolifération cellulaire. Le fait que le gène *steap4* soit fortement exprimé dans les cancers de la prostate, qu'il soit régulé par les androgènes et qu'il induise la prolifération cellulaire laisse penser que ce gène pourrait avoir un rôle dans le développement des tumeurs. Il pourrait faire un bon marqueur pour le diagnostic des cancers de la prostate et un bon outil moléculaire pour mettre au point de nouvelles thérapies. TIARP n'est pas exprimée dans les cellules pré-adipocytes (3T3-L1) avant confluence, alors qu'à partir de 3 jours et jusqu'à 8 jours après la confluence, le niveau d'expression de TIARP augmente comme le niveau d'expression d'autres gènes comme AP2 (**A**dipocyte **l**ipid-**b**inding **P**rotein) et G3PDH (**G**lyceraldehyde **3**-**P**hosphate **D**e**H**ydrogenase) qui sont des marqueurs de la différenciation (Fasshauer et al., 2003). Au cours de la même expérience, le gène *tiarp* n'augmente pas dans la lignée cellulaire de fibroblastes (3T3-C2) même 8 jours après confluence des cellules. Tout cela implique que l'augmentation du gène *steap4* est plus liée à la différenciation des cellules qu'à leur confluence. La transcription du gène *steap4* est induite dans les cellules 3T3-L1 par la protéine TNF α , l'hormone de croissance GH (**G**rowth **H**ormone) et l'IL-6 via la cascade JAK2 (**J**anus **K**inase **2**) et MAPK P42/P44 (**I**nter**L**eukine-**6**) de façon dose et temps dépendants (Fasshauer et al., 2004). La région promotrice du gène *steap4* est régulée par des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des adipocytes comme CEBP α (**C**CAAT/**E**nhancer **B**inding **P**rotein α) et LXR α (**L**iver **X** **R**eceptor α).

Ces souris développent plusieurs pathologies liées au métabolisme. Elles montrent une résistance à l'action de l'insuline et une diminution d'expression de gènes indispensable aux fonctions du métabolisme comme les protéines : ADIPONECTINE, FATTY-ACID-SYNTASE et FATTY-ACID-TRANSPORTER-1 et les récepteurs : GLUT4 (**G**lucose **T**ransporter type **4**) et PPAR γ (**P**eroxisome **P**roliferator-**A**ctivated **R**eceptor γ) (Wellen et al., 2007).

Ces souris knockout montrent une inflammation avec une augmentation de certains gènes inflammatoires comme IL-6, TNF α , MCP-1 (**M**onocyte **C**hemoattractant **P**rotein-1), HAPTOGLOBIN et SOCS-3 (**S**uppressor **O**f **C**ytokine **S**ignaling **3**).

Ces souris présentent de plus une infiltration de l'espace interstitiel entre les adipocytes par des macrophages et une augmentation du taux de NOX et de peroxydation des lipides. Ces deux derniers éléments prouvent qu'en absence de *steap4*, les adipocytes sont capables de stress oxydatif.

On peut aussi noter une forte augmentation du gène *tsap6* alors que les deux autres membres de la famille STEAP semblent avoir une expression plus faible. La protéine STEAP4 joue un rôle dans le mécanisme de différenciation des adipocytes, il joue également un rôle important dans l'homéostasie métabolique et dans la mise en place de mécanismes de défense des adipocytes (Waki et al., 2007).

La protéine TSAP6 ou STEAP3 ou pHyde ou Dudulin-2

La protéine TSAP6 est conservée au cours de l'évolution des métazoaires, ceci laisse envisager un rôle important pour cette protéine dans la cellule (Castillo-Davis et al., 2004) (**Fig. 25**).

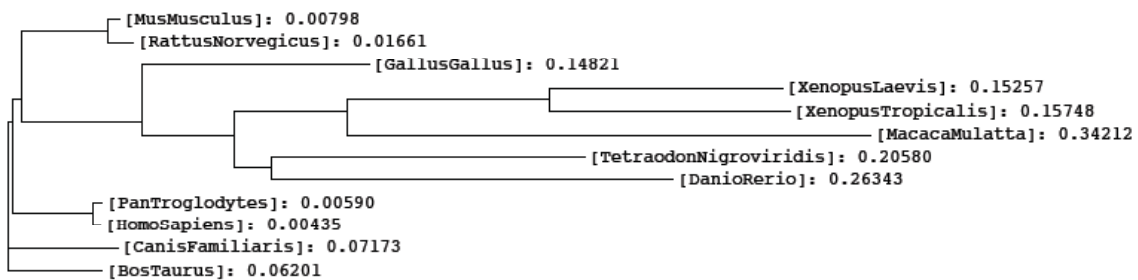


Figure 25 : Conservation des protéines TSAP6 au cours de l'évolution.

Arbre phylogénique des protéines TSAP6 de différentes espèces de métazoaires.

Caractérisation de son expression

À la différence des autres membres de la famille STEAP, le gène *tsap6* est ubiquitairement transcrit dans la plupart des tissus normaux humains (Porkka et al., 2003). Il est également exprimé dans quatre types différents de cellules tumorales de la prostate : PC-3, DU145, LNCap et 22Rv1 indépendamment des récepteurs aux androgènes. Une analyse par Western-Blot montre que l'anticorps dirigé contre un peptide de la protéine TSAP6 reconnaît deux formes ce qui suggère des modifications post-traductionnelles (Passer et al., 2003).

Gène suppresseur de tumeur

Le gène *tsap* a été envisagé comme un gène suppresseur de tumeur. Sa surexpression dans des cellules tumorales de la prostate : LNCaP et DU145 ou du sein MDA231 entraîne l'inhibition de la prolifération et l'apoptose comme d'autres gènes suppresseurs de tumeurs (Steiner et al., 2000) (Rinaldy et al., 2000) (Zhang et al., 2001). L'induction de l'apoptose dans les cellules LTR6 se fait via l'activation du gène *tsap6*. En effet, l'inhibition de l'expression de TSAP6 par l'utilisation d'un antisense dans ces cellules diminue la proportion de cellules entrant en apoptose après activation de la protéine P53 (Passer et al., 2003). Mais statistiquement, l'expression du gène *tsap6* n'est pas associée à la progression des cancers de la prostate *in vivo* et *in vitro* ; il n'y a également pas de mutations fréquentes du gène *tsap6* dans les cancers et seulement un échantillon montre une diminution du nombre de copie du gène. Ces résultats suggèrent que *tsap6* n'est pas un gène suppresseur de tumeurs classique (Porkka et al., 2003). À la différence des travaux effectués sur le cancer de la prostate, les travaux sur la progression du cancer du foie montre clairement que le gène *tsap6* est réprimé dans les stades avancés des cancers du foie contrairement aux cirrhoses (Coulouarn et al., 2005). Ces résultats suggèrent que TSAP6 pourrait être un bon marqueur de progression du cancer du foie.

Une activation CASPASE3-dépendante

L'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose suite à l'activation du gène *tsap6* dans des cellules tumorales de la prostate n'est possible qu'en présence de la protéine CASPASE-3. Les lignées cellulaires tumorales : PC-3 et TSU ne contenant pas de protéine CASPASE-3 ne répondent pas ou peu à la stimulation du gène *tsap6* (Steiner et al., 2000). Le gène *tsap6* stimule CASPASE-3 dans les cellules DU145 (Zhang et al., 2001).

Régulation directe par la protéine P53

Notre équipe a montré l'activation de TSAP6 par P53 au niveau transcriptionnelle et traductionnelle dans plusieurs systèmes cellulaires : les cellules LTR6 maintenues en culture à 32°C, les cellules MCF7 suite à un traitement à l'actinomycine D (ActD) et les cellules Hela

traitées à la doxycycline (Dox) (Passer et al., 2003). Cette activation de l'expression de la protéine TSAP6 par la protéine P53 dans ces lignées cellulaires est le résultat d'une action directe. Notre équipe a identifié chez l'homme et chez la souris, un site de liaison pour la protéine P53 dans la région promotrice du gène *tsap6*. Dans les clones révertants issus des cellules leucémiques, l'activation de la transcription de TSAP6 se fait indépendamment de la protéine P53 puisque dans la plupart de ces cellules tumorales la protéine P53 est mutée et non fonctionnelle.

Les ligands

Pour essayer de comprendre le rôle de TSAP6 dans le processus de l'apoptose, notre équipe a cherché à identifier les ligands de cette protéine. L'analyse des protéines interagissant avec TSAP6, par la technique de double hybride en levure a permis d'identifier plusieurs protéines pouvant être des ligands de TSAP6. Parmi ces protéines, la protéine NIX et la protéine kinase MYT1 ont fait l'objet d'études plus poussées (Passer et al., 2003). La protéine anti-apoptotique TCTP est également un ligand de TSAP6 (Amzallag et al., 2004).

NIX/BNIP3L (**NI**p3-like protein **X**) est une protéine pro-apoptotique de la famille des BCL-2. Lorsqu'elle est activée, elle se transloque à la mitochondrie et induit l'apoptose (Lee et al., 2006). La protéine NIX montre 53 à 56% d'homologie avec la protéine BNIP3 (**BCL-2/E1B 19 kDa-Interacting Protein 3**). Structuralement NIX est une BH3-Only, cette protéine ne contient qu'un seul domaine BH3 responsable de son activité pro-apoptotique et une extrémité COOH transmembranaire permettant son homo-dimérisation et sa fixation à la mitochondrie. La protéine NIX contient une séquence PEST, correspondant à une forte concentration de résidus Proline, acide Glutamique, Sérine, Thréonine et acide Aspartique flanqués de résidus chargés. Cette séquence est fréquemment associée à des protéines à demi-vie courte dont leur dégradation est contrôlée par le protéasome (Rogers et al., 1986). Fonctionnellement, la surexpression de la protéine NIX induit une inhibition de la prolifération des cellules ainsi que l'apoptose. Et inversement l'extinction de la protéine NIX engendre la croissance des cellules cancéreuses et le développement des tumeurs (Fei et al., 2004). Comme son homologue BNIP3, la protéine NIX se lie aux protéines BCL-2 et BCL-xL pour bloquer leur activité anti-apoptotique et déclencher l'apoptose. Le fait que les protéines TSAP6 et NIX interagissent ensemble et que ces deux protéines participent à l'induction de l'apoptose laisse envisager que l'action pro-apoptotique de TSAP6 puisse se faire par le biais de la protéine NIX. Des expériences de surexpression de NIX dans des cellules surexprimant déjà TSAP6 de façon stable montrent une amplification de l'effet de TSAP6, la proportion de mort cellulaire et de cellules apoptotiques est plus importante dans les cellules surexprimants NIX et TSAP6. Dans un autre système cellulaire, l'induction de l'apoptose induite par NIX peut être inversée par l'utilisation d'un antisense TSAP6. Les protéines NIX et TSAP6 coopèrent donc pour induire l'apoptose (**Fig. 26**).

La protéine MYT1 est une protéine associée à la membrane qui régule le passage des cellules en mitose, mise en évidence chez le *Xenope*, chez l'homme et chez la *Drosophila*. Appartenant à la famille des protéines kinases WEE comprenant WEE1, WEE2, MYT1 est la seule protéine capable de phosphoryler les deux résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 de la protéine kinase CDK-1/CDC-2 responsable du blocage des cellules en phase G2 (Mueller et al., 1995) (Price et al., 2002). La protéine MYT1 n'est active que lorsqu'elle est déphosphorylée ; la régulation de cette phosphorylation est effectuée par les protéines MAPK et plus particulièrement par les protéines P90^{RSK} (**P90** kDa **R**ibosomal **S6** **K**inases) et la kinase AKT/PKB/RAC (Okumura et al., 2002). Des expériences de surexpression ou d'extinction de la protéine MYT1 montrent respectivement une inhibition ou une activation

de la prolifération cellulaire. Le fait que la protéine TSAP6 puisse interagir avec la protéine MYT1 et que cette dernière régule la transition G2->M a orienté les investigations vers l'état du cycle cellulaire lors de la surexpression de la protéine TSAP6. Celle-ci induit un blocage des cellules en phase G2. Par Western-Blot, il a été montré que ce blocage se traduit par le maintien de la protéine MYT1 dans une forme hypo phosphorylée active inhibant ainsi l'activité de la protéine CDC2. Ces résultats indiquent que TSAP6 module le passage des cellules en G2->M par l'intermédiaire de la déphosphorylation de la protéine MYT1 (**Fig. 26**).

Ces résultats nous éclairent sur la manière dont la protéine TSAP6 peut induire l'apoptose grâce à son interaction avec la protéine NIX et comment elle peut induire l'arrêt du cycle grâce à son interaction avec la protéine MYT1.

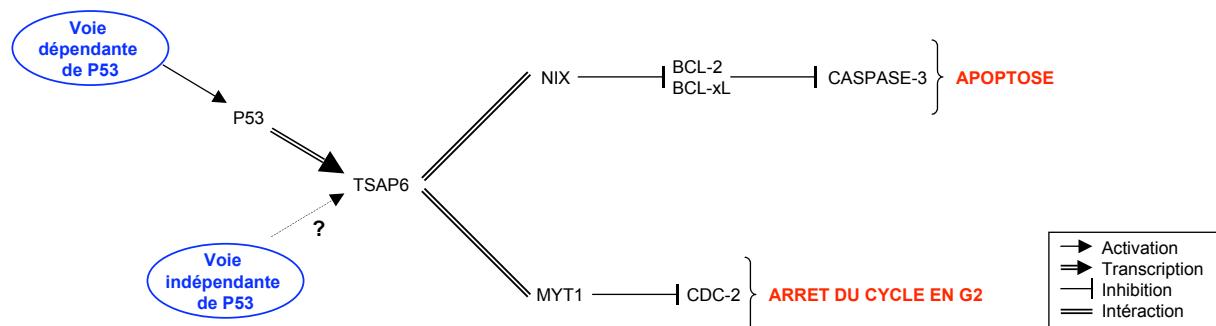


Figure 26 : Rôle de TSAP6 dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle en G2.

En se liant à NIX et à MYT1, TSAP6 coopère à l'induction de l'apoptose et à l'arrêt du cycle cellulaire en G2 lors de son activation par la protéine P53 dans les cellules LTR6. Dans les modèles révertants l'expression de TSAP6 est également activée mais cette activation est indépendante de P53.

Comme nous le verrons en détail dans le chapitre suivant, la protéine TSAP6 se lie également à TCTP une protéine anti-apoptotique qui a des fonctions à l'intérieur de la cellule mais également à l'extérieur. La protéine TSAP6 régule la sécrétion de cette protéine.

Régulation d'une voie de sécrétion

Notre équipe en 2004 et le groupe de Levine en 2006 ont montré qu'il y avait un lien entre la protéine TSAP6 et la régulation d'une des voies de sécrétion non classique (Amzallag et al., 2004) (Yu et al., 2006).

Il existe différentes voies de sécrétion des protéines. Certaines protéines ayant un signal dans leurs séquences sont sécrétées hors de la cellule ou assignées à un organe spécifique par la voie de sécrétion classique *RE/Golgi* (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Mais d'autres protéines dépourvues de signal peptide sont sécrétées par des voies différentes. Ces voies sont longtemps restées un mystère pour les scientifiques et sont encore à ce jour mal connues. On les appelle communément les voies de sécrétion non-classiques (Nickel et al., 2003). La voie de sécrétion classique qui permet de réguler l'adressage des protéines nouvellement synthétisées, des carbohydrates et des lipides à la surface de la cellule est nécessaire à la croissance et l'homéostasie de la cellule. C'est la voie principale d'exportation des protéines extracellulaires (Palade et al., 1975). Elle se fait au travers de 2 organites principaux : le RE et le Golgi ainsi que des organites annexes comme des vésicules (lysosomes, endosomes) et un réseau tubulaire sur lequel se dirigent ces vésicules pour passer d'un organe à un autre (**Fig. 27**).

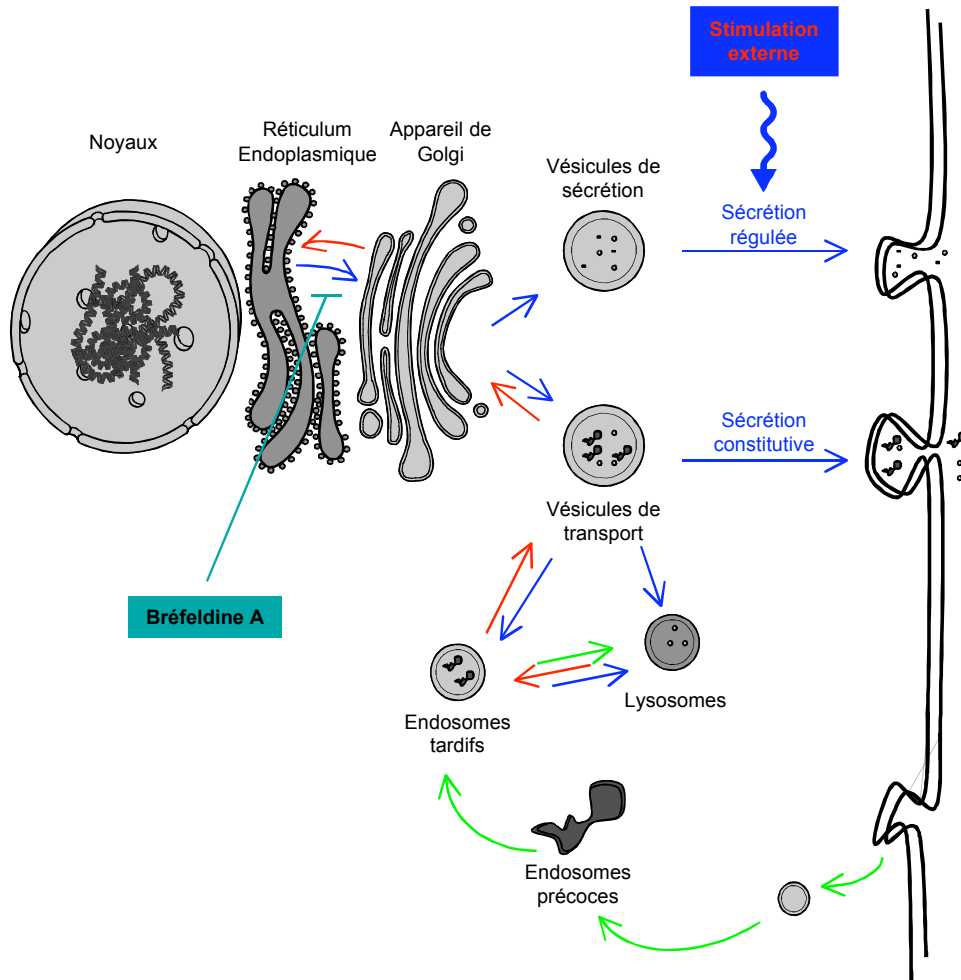


Figure 27 : La voie de sécrétion classique.

Les protéines sécrétées suivent la voie de sécrétion classique RE/Golgi (flèches bleues). La voie d'endocytose est représentée avec les flèches vertes. La voie de recyclage est représentée avec des flèches rouges.

Il existe deux mouvements dans la cellule ; celui de la sortie de matériel : les vésicules formées dans le RE sont transportées dans le Golgi puis dans le TGN et se dirigent enfin dans le cytoplasme pour fusionner avec la membrane plasmique et celui en sens inverse ou « voie rétrograde » permettant le recyclage des membranes et des protéines dans leurs organites originels. C'est au cours de la traversée des organites comme le RE et le Golgi que les protéines subissent leurs modifications post-traductionnelles. Ce sont les travaux de Günter Blobel (Prix Nobel de médecine en 1999) qui ont mis en évidence l'existence de peptides signaux qui gouvernent l'adressage des protéines dans la cellule. Ces peptides-sigaux composés de 15 à 60 résidus fonctionnent comme peptide ou région-signal suivant qu'ils sont localisés à l'extrémité de la protéine ou à l'intérieur. Ce sont ces signaux qui sont reconnus par des récepteurs protéiques situés sur les organites cibles et permettent l'adressage des protéines. En fait tous les compartiments de cette voie de sécrétion classique RE-Golgi sont continuellement en relation entre eux grâce aux vésicules qui bourgeonnent d'une membrane pour fusionner avec une autre. Ce transport membranaire et protéique suit un flux directionnel hautement organisé qui permet à la cellule de sécréter et de s'alimenter.

La voie RE/Golgi n'est pas l'unique possibilité de sortie pour les protéines sécrétées. Beaucoup de protéines peuvent être sécrétées par d'autres voies. Ces protéines ont été décrites à la fois chez les bactéries et les levures mais également chez les eucaryotes (Nickel et al., 2003). Ces protéines sécrétées par ces voies non-classiques ont quatre particularités : elles n'ont pas de peptide-signal, elles sont totalement exclues de la voie RE-Golgi, leur sécrétion n'est pas bloquée par l'utilisation de la BFA et leur sécrétion est souvent régulée par des processus spécifiques comme i) la différenciation de cellules, ii) les modifications post-traductionnelles des protéines comme la phosphorylation ou iii) la régulation par une voie de signalisation (Lutomski et al., 1997) (Maizel et al., 2002) (Wakisaka et al., 2002). On peut constater deux voies distinctes dans la sécrétion non-classique, celles qui libèrent directement dans le milieu extracellulaire des protéines isolées « par translocation » et la sécrétion de petites vésicules contenant elles-mêmes des protéines diverses « par vésiculation » (Fig. 28).

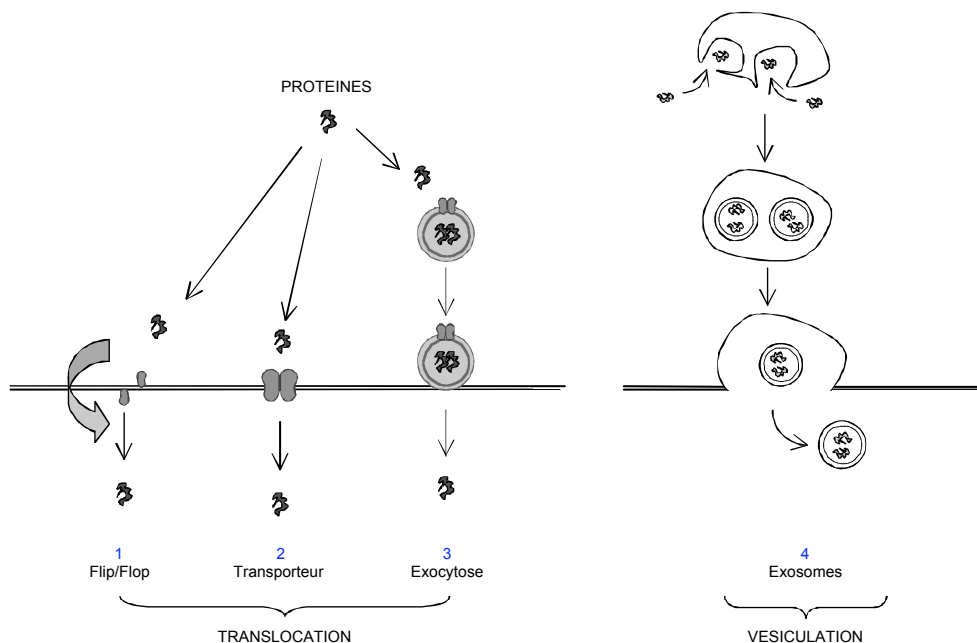


Figure 28 : Quelques voies de sécrétion non classique.

Les protéines ne contenant pas de peptide-signal dans leurs séquences utilisent d'autres voies pour sortir de la cellule. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la sécrétion de ces protéines dépourvues de peptide-signal (Nickel EurJBioch 2003) : le flip-flop à la membrane, la translocation directe à la membrane à travers des transporteurs, le recyclage des protéines récupérées par exocytose et les exosomes

Les protéines sécrétées par les voies de sécrétion non-classique peuvent avoir un rôle intracellulaire ou extracellulaire. Mais certaines protéines ont une double fonction agissant à l'intérieur de la cellule et à l'extérieur et ce type de sécrétion pourrait permettre cette double fonction. Elles peuvent intervenir dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou comme médiateur de l'inflammation ou de la réponse immunitaire. Elles sont souvent caractérisées par une grande activité biologique. La sécrétion par voie non-classique est faible et lente, mais les protéines sécrétées de cette manière sont généralement très actives.

Les exosomes ont été décrits à l'origine comme de petites vésicules de 50 à 100nm de diamètre d'origine endosomale, larguées par les réticulocytes pendant leur maturation en érythrocytes (Pan et al., 1983) (Johnstone et al., 1987). Sa fonction première a été

l'élimination de protéines membranaires comme le récepteur à la transferrine (TF-R), la protéine HSP-70 (**H**eat **S**hock **P**rotein-**70**), la protéine AChE (**A**cetyl**C**holine-**E**sterase) ou les transporteurs de nucléotides des réticulocytes. Des études ont montré que d'autres types cellulaires sont capables de sécréter des exosomes suite à leurs activations. Les lymphocytes T (CD4+ et CD8+), les lymphocytes B, les mastocytes, les cellules dendritiques et les plaquettes sécrètent des exosomes (Peters et al., 1989) (Riolland et al., 2006) (Raposo et al., 1997) (Heijnen Blood 1999) (Zitvogel et al., 1998). Dans le cas de cellules hématopoïétiques, la sécrétion d'exosomes est la plupart du temps liée à la maturation des cellules durant laquelle celle-ci cherche à se débarrasser de protéines indésirables ou d'une partie de leur membrane ou de leurs organelles. D'autres types cellulaires comme les cellules tumorales de diverses origines, les cellules épithéliales, les cellules microgliales du système nerveux et les fibroblastes peuvent aussi sécréter des exosomes de façon constitutive (Wolfers et al., 2001) (van Niel et al., 2001) (Faure et al., 2006). Les exosomes ont également été identifiés *in vivo* dans des liquides biologiques comme les urines, le sérum du sang, le fluide épидидymaire, les ascites tumorales, le liquide broncho-alvéolaire des poumons, les effusions pleurales et à la surface des cellules dendritiques folliculaires dans les amygdales (Pisitkun et al., 2004) (Caby et al., 2005) (Andre et al., 2002) (Bard et al., 2004).

Quelles que soient leurs origines cellulaires, les exosomes ont quelques particularités communes : leur taille (50 à 100 nm de diamètre), leur densité sur gradient de sucrose (1,13 à 1,20 g/ml) et leur composition protéique. La manière la plus répandue pour purifier des exosomes est une succession de centrifugation pour éliminer les cellules mortes et les gros débris cellulaires et une centrifugation à très forte vitesse pour recueillir les exosomes.

Les exosomes sont les vésicules internes des endosomes tardifs (Late Endosome) multi-vésiculaires ou MVB (**M**ulti-**V**esicular-**B**odies). Ils sont formés par invagination de la membrane endosomale vers l'intérieur de l'endosome. Après avoir bourgeonné, les exosomes s'accumulent dans la lumière endosomale jusqu'à ce que la membrane de l'endosome fusionne avec la membrane plasmique. Les exosomes sont alors sécrétés dans le milieu extracellulaire (**Fig. 29**). Une fois sécrétés dans le milieu extracellulaire, les exosomes fusionnent avec d'autres cellules pour leur transférer leurs lipides, leurs protéines cytoplasmiques et membranaires. Les exosomes servent à la fois à éliminer des protéines obsolètes mais également de messagers intercellulaires. Théoriquement, toutes les cellules qui contiennent des compartiments multi-vésiculaires doivent pouvoir sécréter des exosomes. Si l'on prend l'exemple des réticulocytes, durant leur maturation et selon une estimation de leur taille finale, chaque réticulocyte expulse 10^{14} exosomes par jour dans le sang (Blanc et al., 2005). La sécrétion des exosomes doit être contrôlée par la cellule mais le mécanisme reste encore mal connu. Cette sécrétion pourrait être régulé par le calcium, la protéine RAB-11 ou la PHOSPHOLIPASE D2 (Savina et al., 2003), (Raposo et al., 1997) (Savina et al., 2005). L'activation de la protéine P53 pourrait induire la sécrétion des exosomes (Yu et al., 2006).

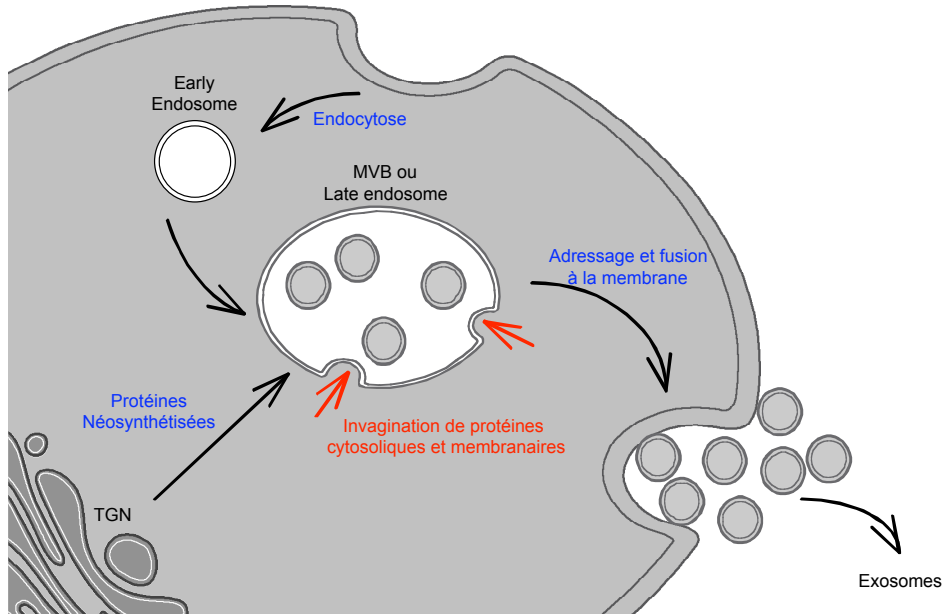


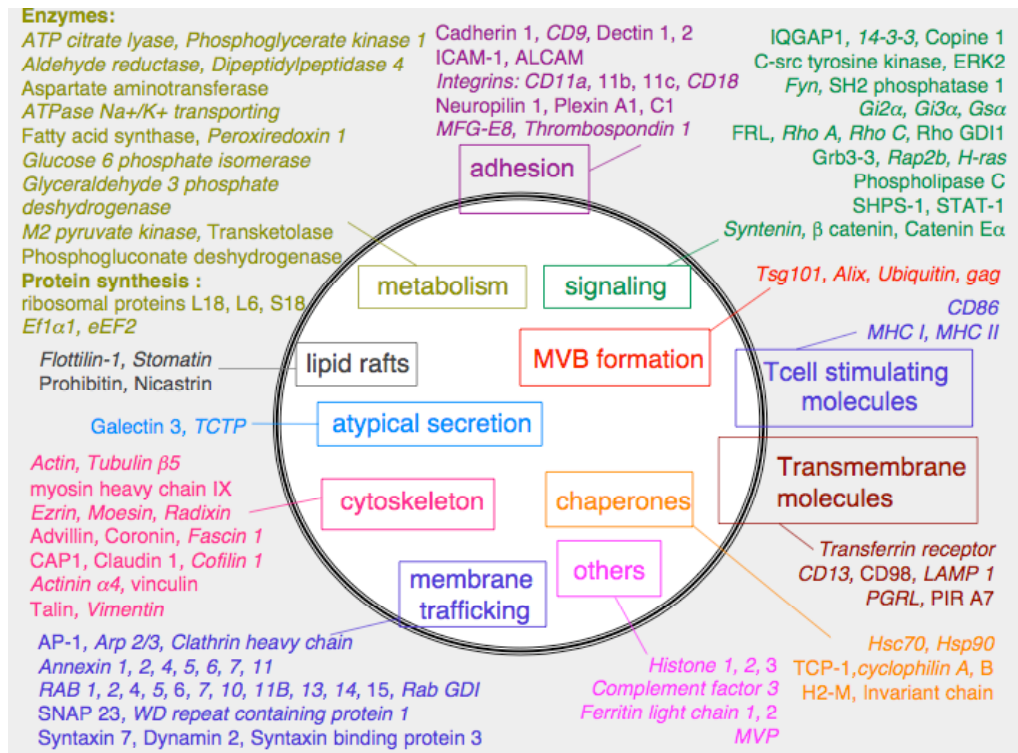
Figure 29 : Formation et sécrétion des exosomes.

Les exosomes sont accumulés par invagination de la membrane dans MVB puis ils sont libérés dans le milieu extracellulaire après fusion de la membrane du MVB avec la membrane de la cellule.

La composition protéique des exosomes a été réalisée sur des exosomes issus de différents types cellulaires et les protéines qu'on y trouve sont variées (Segura et al., 2005) (Faure et al., 2006) (**Fig. 30**).

La particularité de la composition protéique des exosomes montre bien qu'il ne s'agit pas de vésicules sécrétées par des cellules apoptotiques (Thery et al., 2001). Aucune protéine des mitochondries, du RE, du Golgi ou du noyau n'est présente dans ces exosomes. Les protéines qui composent les exosomes sont des protéines cytosoliques ainsi que des protéines de la membrane plasmique et des protéines qui régulent l'endocytose. La diversité des protéines entrant dans cette composition laisse envisager que ces vésicules pourraient avoir un rôle à l'extérieur de la cellule. Mais les exosomes ne contiennent pas toutes les protéines membranaires présentes à la membrane des cellules sécrétrices, il y a un tri protéique. Les exosomes contiennent des protéines du cytosquelette (ACTINE, TUBULINE...) et des protéines impliquées dans la fusion des membranes et le transport des molécules (les protéines de la famille des ANNEXINES et des RAB). D'autres protéines comme ALIX et TSG101 participent aussi à la formation des MVB dans la cellule. Les exosomes contiennent également des protéines impliquées dans la transduction du signal 14-3-3 σ , PKC ... et des protéines responsables de la présentation des antigènes HSP-70, HSP-90 ... qui peuvent induire une activité anti-tumorale via une réponse immunitaire. Des composants importants des exosomes ce sont les protéines de la famille des TETRASPANES et des INTEGRINES qui interagissent avec d'autres protéines. Ceci laisse envisager que les exosomes pourraient être impliqués dans l'organisation de complexes moléculaires ou membranaires (Hemler et al., 2003). Un autre composant protéique très important des exosomes est sans doute la protéine MFG-E8 ou Lactadherin impliquée dans la capture des corps apoptotiques par les phagocytes. Les exosomes pourraient également avoir un rôle dans la stimulation cellulaire des lymphocytes T puisqu'ils contiennent des protéines responsables de la présentation de l'antigène comme MHC classe I et II ou CD86. D'autres protéines membranaires spécifiques comme ICAM1 de la famille des Ig ou CD13 et CD26 permettent peut-être d'adresser les

exosomes à des cellules cibles. La présence de molécules GPI (CD55 et CD59) ou le récepteur CD35 à la surface des exosomes suggèrent qu'ils pourraient être protégés contre la formation du complexe MAC (**M**embrane **A**ttack **C**omplexe). Le complexe MAC forme un canal transmembranaire à la membrane plasmique de la cellule, ce qui provoque la mort cellulaire. Les exosomes expulsent également de la cellule des protéines anti-apoptotiques comme ALIX, Thioredoxine peroxydase ou TCTP (Amzallag et al., 2004).



(d'après Segura et al., 2005).

Figure 30 : Composition protéique des exosomes.

La composition lipidique ainsi que le ratio protéines/lipides et le ratio phospholipides/cholestérol des exosomes sont similaires aux cellules qui les sécrètent (Johnstone et al., 1987) (Vidal J et al., 1989) (Heijnen et al., 1999). Les exosomes sécrétés sont enrichis en sphingomyéline (SM) et légèrement appauvris en phosphatidylcholine (PC) (Subra et al., 2007). La distribution des phosphatidylethanolamine (PE) est asymétrique et la possibilité de flip-flop des lipides entre les 2 faces de la membrane est augmentée.

La composition protéique des exosomes varie en fonction du type cellulaire qui les sécrète. On peut donc penser que le rôle de ces petites vésicules va dépendre de la cellule d'origine. La libération d'exosomes contribue à la différenciation des érythroblastes, mais les exosomes peuvent aussi servir de messenger intercellulaire dans un système de communication indépendant des cellules. Il n'y a pas de véritable consensus sur le rôle des exosomes. Leur fonction dépend du type cellulaire d'origine mais également de l'état dans lequel les cellules se trouvent.

1) Elimination des protéines obsolètes

Les exosomes qui dérivent des réticulocytes ont probablement pour unique fonction le relargage vers l'extérieur de la cellule des protéines non nécessaires au maintien de la

cellule (Vidal et al., 1997). Il se peut également que la sécrétion par les exosomes des ATPases (Na⁺ et K⁺) contribue à la régulation du volume cellulaire (Blanc et al., 2005).

2) Inducteur de la tolérance et de la réponse immunitaire

Les exosomes qui dérivent des cellules dendritiques, des mastocytes, des cellules épithéliales, des lymphocytes B ou des cellules tumorales présentent à leurs membranes des molécules du MHC de classe I et/ou II, des molécules costimulatrices (CD86, CD40, IL-1 β , RANTES), des molécules HSPs et des antigènes qui sont capables de stimuler directement ou indirectement via des cellules APC (**A**ntigen **P**resenting **C**ell) les lymphocytes T (CD4⁺ ou CD8⁺) et d'induire une réponse immunitaire (Andre et al., 2004) (Segura et al., 2005) (Zitvogel et al., 1998) (Wolfers et al., 2001). Cette réponse immunitaire peut être salutaire pour la cellule ou non. Les exosomes peuvent être à la fois **immuno-stimulateur** ou **immuno-suppresseur**. Ils peuvent inhiber le rejet d'une greffe ou l'accélérer suivant l'état (immature ou mature) des cellules dendritiques qui les ont sécrétées (Peche et al., 2006). Les exosomes participent à la tolérance en présentant des peptides du soi ou en augmentant le nombre de cellules T régulatrices (CD4⁺, CD25⁺ reg) ou encore en favorisant la délétion des cellules T.

3) Inducteur d'une réponse anti-tumorale

Les exosomes sécrétés par les mastocytes sont capables de stimuler la prolifération cellulaire des lymphocytes B et T. De plus, des exosomes dérivés de cellules dendritiques couplés à un antigène tumoral sont capables d'arrêter la croissance et d'éradiquer une tumeur dans une souris (Zitvogel et al., 1998). Enfin, les exosomes sécrétés de cellules tumorales de mélanomes contiennent des antigènes tumoraux MART1 (**M**elanoma associated **A**ntigen **R**ecognized by **T**-cells 1), GP100, TRP et HER2. Ré-injectés dans des animaux, ces exosomes sont capables de transférer l'antigène tumoral à des cellules dendritiques qui vont induire un effet anti-tumoral via la stimulation des LTC (Wolfers et al., 2001). Des programmes d'essais cliniques sont en cours afin de tester la potentialité d'utiliser les exosomes dans des mécanismes d'immunothérapie afin de soigner des cancers. Deux études réalisées en France d'une part sur des mélanomes métastatiques et d'autre part sur des cancers pulmonaires « non small cell » (NSCLC) ont déjà fait l'objet de publications (Morse et al., 2005) (Chaput et al., 2006). Ces études ont consisté à administrer des exosomes recouverts de l'antigène MAGE3 (**M**elanoma **A**nti**G**En family **3**) à des patients atteints de cancers exprimant cet antigène. Les résultats ont montré une régression des tumeurs chez certains et une réduction des métastases chez d'autres. D'autres essais cliniques de phase I se sont déroulés chez des patients atteints de cancer pulmonaire « non small cell » et de cancer du col de l'utérus. Les résultats préliminaires montrent une stabilisation prolongée de la maladie. Un essai clinique de phase II franco-américain est planifié.

4) Transfert d'agents pathogènes

De nombreux virus MuLV (**M**urine **L**eukemia **V**irus), HIV-1 (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus type **1**) et MoMuLV (**M**oloney **M**urine **L**eukemia **V**irus) enveloppés détournent la machinerie des exosomes pour se répliquer. La protéine PRION à l'origine des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) est libérée des cellules en association avec les exosomes (Fevrier et al., 2005).

Des expériences par double hybride ont montré une interaction entre les protéines TSAP6 et TCTP. TCTP est une protéine anti-apoptotique exprimée dans de nombreux types cellulaires. Surexprimée dans de nombreux cancers, elle a aussi été décrite comme une protéine sécrétée et pouvant stimuler la sécrétion d'histamine, c'est pourquoi elle est aussi appelée HRF (**H**istamine-**R**eleasing **F**actor) (MacDonald et al., 1995) (voir le chapitre suivant). Étant donné que les protéines de la famille STEAP ont été proposées pour avoir un rôle dans le trafic de vésicules et la sécrétion de protéines et que TCTP a déjà été montré comme être sécrétée, l'effet de la surexpression de TSAP6 sur les voies de sécrétion a été étudié. Il a été mis en évidence que la sécrétion de la protéine TCTP est stimulée par la surexpression de la protéine TSAP6 via des voies de sécrétion non classique et en particulier la voie des exosomes (Amzallag et al., 2004). D'un autre côté, le groupe de Levine a mis en évidence que l'induction de la protéine P53 suite à une exposition aux γ -irradiations, induit la sécrétion de protéines par la voie de sécrétion classique ainsi que la production d'exosomes dans deux types cellulaires. Cette production d'exosomes est spécifique de l'activation la protéine P53 puisque les cellules qui en sont dépourvues n'induisent pas cette augmentation de production d'exosomes (Yu et al., 2006).

Le gène *tsap6* a été mis en évidence dans des modèles de réversion tumorale. Il est surexprimé dans les clones révertants ayant perdu un peu de leur phénotype cancéreux comparé aux cellules tumorales mères. Il est aussi régulé de manière directe par la protéine P53, sa surexpression et/ou activation induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Fig. 31).

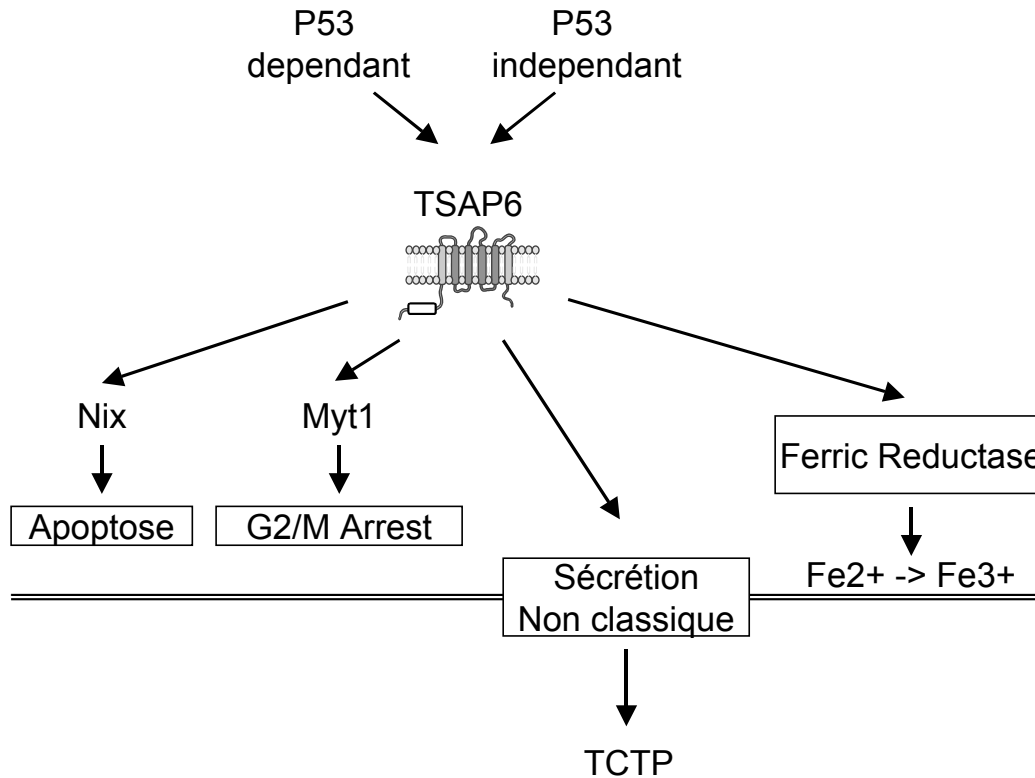


Figure 31 : Récapitulatif sur les connaissances de TSAP6.

Le gène *tsap6* code pour une protéine pro-apoptotique à 6 domaines transmembranaires appartenant à la famille des STEAP conservées entre les espèces et qui est exprimée de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus. TSAP6 est localisée dans la cellule avec la membrane plasmique et autour du noyau. De plus, cette protéine pro-apoptotique interagit et aide à la sécrétion de TCTP une protéine anti-apoptotique, ce qui conforte sa fonction. Ce gène pourrait avoir un rôle important dans la régression des tumeurs et sa caractérisation en fait une cible intéressante pour de nouvelles thérapies contre les cancers.

TCTP

Le gène *tpt1* code pour la protéine TCTP nommée également P23, P21, Q23, HRF, MMI-1 (Microtubule and Mitochondria Interacting Protein-1), YKL056C, TMA19 ou FORTILIN. Tout d'abord nommée Q23, P21 ou encore P23 par plusieurs groupes étudiant simultanément les gènes régulés au niveau transcriptionnel c'est à la fin des années 1980 que l'on nomma cette protéine Translationally Controlled Tumor Protein pour avoir été clonée à partir de tumeur et être régulée au niveau transcriptionnel (Thomas et al., 1981) (Yenosky et al., 1982) (Benndorf et al., 1988) (Bohm et al., 1989) (Gross et al., 1989). Il s'est avéré plutard que cette protéine n'était pas uniquement spécifique des cellules cancéreuses et que de plus elle était également régulée au niveau post-transcriptionnelle. Au même moment, dans les années 1980, un autre groupe s'intéressait au rôle de TCTP sur le relarguage d'histamine et avait appelé cette protéine HRF pour Histamine Releasing Factor (Ezeamuzie et al., 1983). TCTP est un « housekeeping » gène, il s'exprime de façon ubiquitaire dans toutes les cellules. On peut donc penser que cette protéine a un rôle universel dans le maintien de la viabilité des cellules ou une fonction biologique commune à toutes les cellules en comparaison à des gènes spécifiques à un type de cellule.

Caractérisation du gène *tpt1*

Le gène *tpt1* est localisé sur le Chr. 14 chez la souris (Chr. 14D3) et sur le Chr. 13 chez l'homme (Chr. 13q12->q14) et comprend six exons dont cinq codants comme chez le lapin, le rat ou *Trichinella pseudospiralis* (Fiucci et al., 2003) (de Fatima Bonaldo et al., 1996) (MacDonald et al., 1999) (Thiele et al., 1998) (Mak et al., 2007). Par ailleurs, chez les mammifères comme chez la souris, l'homme, le rat et le lapin, de nombreux pseudogènes à TCTP ont été mis en évidence dans leur génome (Thiele et al., 2000).

Structure du gène

Chez l'humain comme chez le lapin, le gène *tpt1* est transcrit sous deux formes : deux ARNm de longueur sdifférentes générées par deux sites de polyadénylation AATAAA dans leur partie 3'UTR non traduite (Li et al., 2001). Chez le lapin comme chez l'homme, c'est l'ARNm le plus court qui est le plus abondant au niveau des tissus. L'ARNm *tpt1* montre les caractéristiques des gènes régulés au niveau transcriptionnel. Il contient dans sa partie 5'UTR un polyT suivi d'une région riche en GC comme les ARNm des protéines ribosomales (Chitpatima et al., 1988). Dans sa partie 3'UTR, le gène *tpt1* murin contient des ARE (AU-rich Element) consistant en une répétition de la séquence AUUUA qui ont pour rôle de stabiliser les ARNm et qu'on retrouve fréquemment dans les régions 3'UTR des cytokines à demi vie courte comme IL-2 (Yang et al., 2005). L'ARNm de *tpt1* grâce à sa région 5'UTR riche en GC peut adopter une structure secondaire et se lier *in vitro* et *in vivo* à la protéine PKR (Protein Kinase RNA activated) (Bommer et al., 2002). Cette interaction permettrait d'activer la PKR et de réguler au niveau transcriptionnel l'expression de TCTP.

Pseudogènes

Des criblages par BLAST montrent que des séquences présentant 100% d'homologie avec le gène *tpt1* mais ne contenant pas d'introns se retrouvent sur plusieurs chromosomes chez le lapin, l'humain, le rat ou la souris (Fiucci et al., 2003) ([Annexe 4](#)) (Thiele et al., 1998) (Thiele et al., 2000). Il s'agit de gènes rétrotransposés ou gènes insérés dans le génome après rétrotranscription. Ces séquences rétrotransposées possèdent une queue polyA à l'extrémité 3' ainsi que des séquences répétées de chaque côté du gène caractéristiques communes aux

pseudogènes rétrotransposés. Une recherche par BLAST montre qu'il existe 15 pseudogènes chez l'humain, 18 chez le rat, 13 chez la souris ou encore 10 à 15 chez le lapin.

Promoteur

Plusieurs études de la région promotrice de TCTP ont été faites dans différentes espèces comme chez l'homme, la souris, le lapin ou *Bombix mori* et montrent que le promoteur de TCTP est assez conservé entre les mammifères (Yang et al., 2005) (Fiucci et al., 2003) (Thiele et al., 1998) (Lee et al., 2004). Ce promoteur d'une longueur d'environ 500bp contient une TATAbox en position -30 du site de transcription « ATG » et des sites de liaisons pour des facteurs de transcription comme Sp1, NF1, AP1, c-Ets1, CP2, MZF1 et d'autres. Une étude récente a montré que le cobalt pouvait induire la transcription de *tpt1* en se liant sur le promoteur de TCTP (Schmidt et al., 2007).

Caractérisation de la protéine TCTP

La protéine TCTP contient 172 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 23 kDa et un point isoélectrique à 4,9 (Sanchez et al., 1997). La comparaison de la séquence de la protéine TCTP avec les autres protéines n'a révélé aucune homologie avec d'autres familles protéiques à l'exception de deux domaines TCTP-1 et TCTP-2 communs à toutes les protéines de TCTP et conservés au cours de l'évolution (Bohm et al., 1989). Ces deux motifs spécifiques : **TCTP-1** : [IFAED]-[GA]-[GASF]-N-[PAK]-S-[GTA]-E-[GDEVCF]-[PAGEQV]-[DEQGAV] et **TCTP-2** : [FLIV]-x(4)-[FLVH]-[FY]-[MIVCT]-G-E-x(4,7)-[DENP]-[GAST]-x-[LIVM]-[GAVI]-x(3)-[FYWQ] n'ont encore pas de fonctions associées connues. Ce n'est qu'en 2001 que la publication de la structure tertiaire de TCTP montre une homologie de structure avec la petite protéine chaperone MSS4/DSS4 (Thaw et al., 2001).

Conservation entre les espèces

La protéine TCTP est présente chez les mammifères mais plus largement chez l'ensemble des eucaryotes comme les poissons, les vers de terre, les végétaux et les champignons (Gachet et al., 1999) (Yan et al., 2000) (Lee et al., 2004) (Bangrak et al., 2004) (**Fig. 32**). L'alignement de ces séquences montre une forte conservation entre les espèces malgré l'évolution. Environ 86% d'homologie dans la séquence nucléique entre TCTP humain et P23 murin et 96% d'homologie au niveau protéique entre ces deux mêmes organismes (Gross et al., 1989). Le degré de conservation entre TCTP humain et TCTP souris est inhabituellement fort : 95% alors qu'il est de 72% pour Bcl-2 entre ces deux mêmes espèces (Li, Zhang et al., 2001). Ceci laisse à penser que TCTP a une fonction physiologique cellulaire importante (Bini et al., 1997) (Thaw et al., 2001). On peut penser également que les domaines TCTP-1 et TCTP-2, régions les plus conservées au cours de l'évolution sont sans doute des zones potentiellement importantes pour la fonction de la protéine TCTP. TCTP est aussi exprimée dans de nombreux parasites comme *Plasmodium falciparum*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* et *Schistosoma mansoni* qui possèdent tous une activité de sécrétion d'histamine (MacDonald et al., 2001) (Rao et al., 2002) (Gnanasekar et al., 2002).

Localisation cellulaire

TCTP endogène est une protéine cytoplasmique qui n'est associée à aucun organe de la cellule mais qui montre une colocalisation avec les μ -tubules par immunofluorescence dans les lignées cellulaires COS et NIH-3T3 et peut transloquer à la mitochondrie chez la levure en réponse à un signal apoptotique (Gachet et al., 1997) (Gachet et al., 1999) (Rinnerthaler et al., 2006). D'autres expériences de surexpression de Flag-TCTP dans la lignée cellulaire Hela

montrent que la construction Flag-TCTP est localisée au niveau du cytoplasme ainsi que dans le noyau (Li et al., 2001).

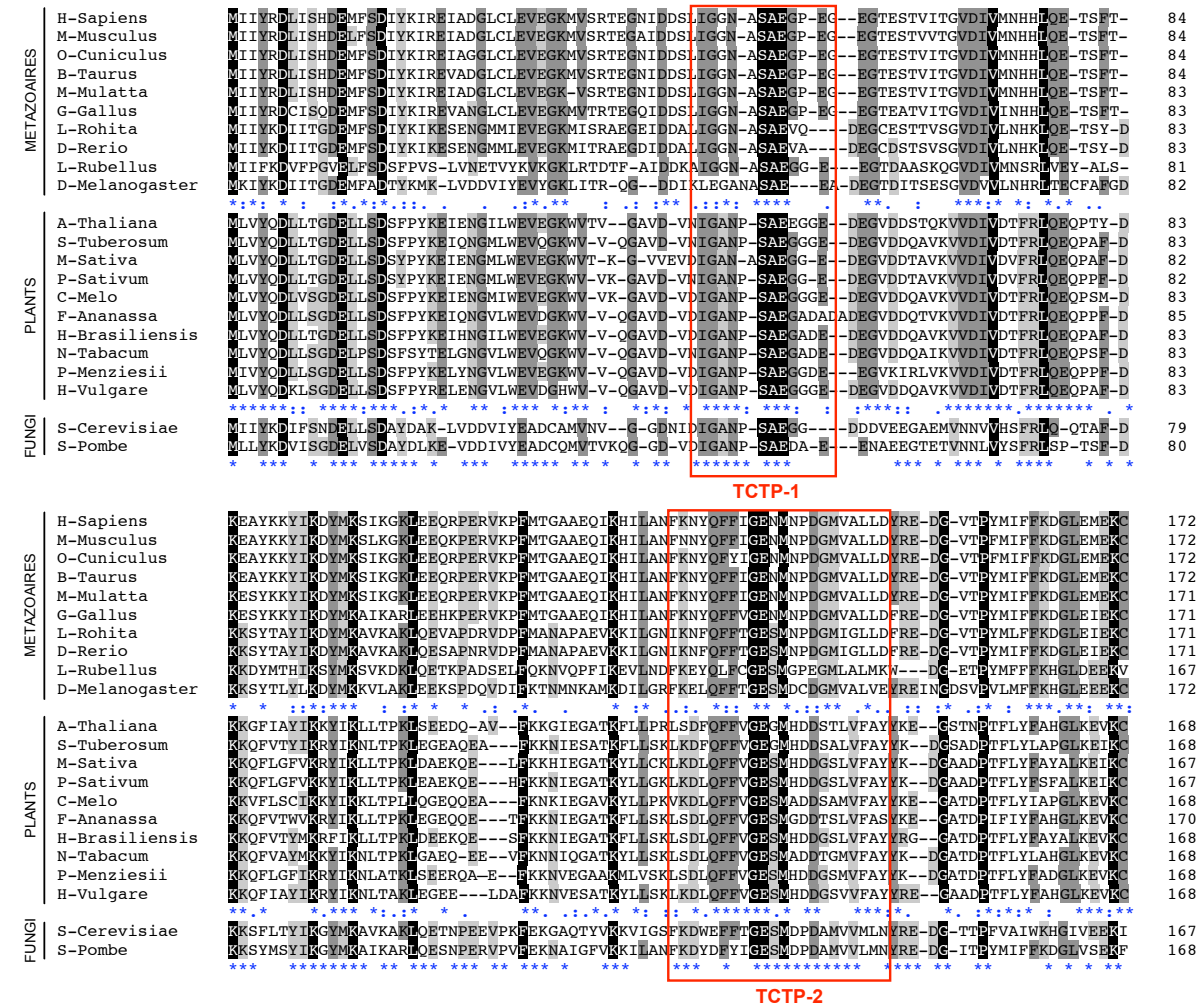


Figure 32 : Alignement des séquences de la protéine TCTP de 22 espèces différentes.

Les séquences sont d'abord comparées par genre : (*) 100% d'homologie, (:) 90% et (.) 80%. Les séquences sont ensuite toutes comparées ensemble (X) 100% d'homologie, (X) entre 75 et 100% et (X) entre 50 et 75%. Les motifs TCTP-1 & 2 fortement conservés au cours de l'évolution sont encadrés en rouge.

Structure

Le gène *tpt1* code pour une protéine hydrophile de 172 résidus sans signal de localisation au noyau ou de régions hydrophobes comme des domaines transmembranaires ou des points d'ancrages dans la membrane (Li et al., 2001). L'étude de la distribution des résidus en fonction de leur charge montre que TCTP est polarisée : 2 régions acides séparées par une région plus basique entre les résidus 79 à 123. À ce jour, plusieurs structures tridimensionnelle (3D) de TCTP ont été publiées. Par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) les structures de TCTP de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (1H6Q & 1H7Y) et de l'humain (2HR9) ont été publiées (Thaw et al., 2001) (Feng et al., 2007). La structure de TCTP du parasite *Plasmodium knowlesi* (1TXJ) a été résolue par cristallographie avec une résolution de 2Å (Vedadi et al., 2007).

Selon les espèces et les méthodes utilisées, la structure de TCTP consiste en 2 à 3 hélices α et 10 à 11 feuillets β , organisés en quatre grands domaines (**Fig. 33**).

- 1- Un domaine constitué essentiellement de feuillets β , dont la séquence est hautement conservée et qui joue un rôle dans les interactions moléculaires de la protéine.
- 2- Une région flexible avec une boucle libre contenant le domaine conservé TCTP-1 où pourrait se lier l'ATP.
- 3- Une région constituée des hélices α formant la partie basique de TCTP et qui pourrait être impliquée dans la liaison avec le calcium et les microtubules.
- 4- Un dernier domaine constitué de feuillets β impliqué dans l'homodimérisation de TCTP, la liaison avec la protéine Na,K-ATPase et contenant le domaine conservé TCTP-2.

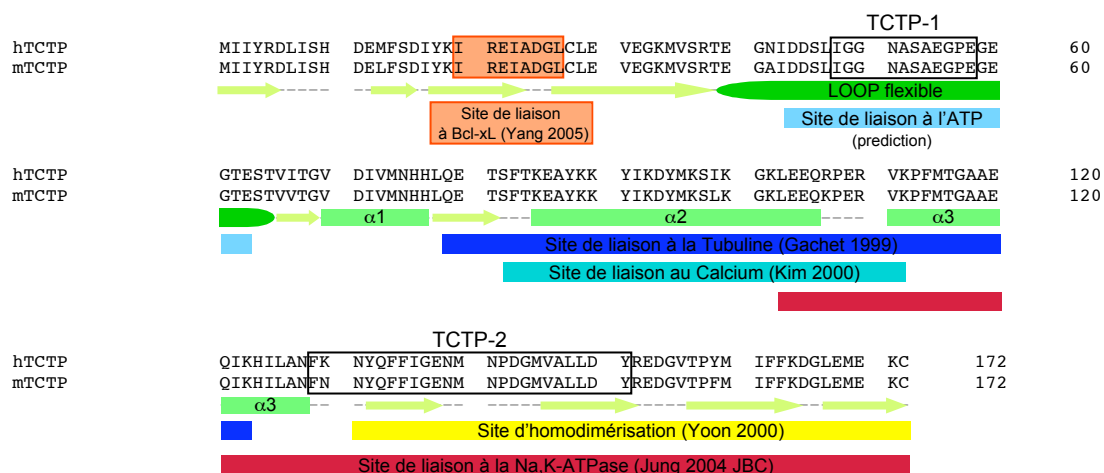


Figure 33 : Structure secondaire et localisation des domaines liés aux fonctions de TCTP.

La première structure publiée de TCTP (1H6Q et 1H7Y) fut la structure par RMN de la protéine de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Baxter et al., 2000) (Thaw et al., 2001). Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence une homologie structurale avec la petite protéine chaperone humaine MSS4 (Mammalian Suppressor of Sec4) qui est une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) pour les protéines de la famille RAB. Ces protéines G qui appartiennent à la superfamille des protéines RAS sont impliquées dans le transport des vésicules dans les voies de sécrétion. Le site de liaison de RAB sur MSS4 correspond à une région très conservée chez TCTP. Cette homologie structurale entre TCTP et MSS4 suggère que TCTP pourrait agir comme une protéine chaperone.

Plusieurs études montrent que la protéine TCTP peut s'homodimériser (Yoon et al., 2000) (Bhisutthiban et al., 2001). La région C-terminal correspondant aux résidus 126 à 172 serait impliquée dans cette homodimérisation, mais actuellement cette dimérisation n'est associée à aucune fonction.

Dans la structure de TCTP humain obtenue par RMN les 11 feuillets β et les 3 hélices α forment 4 structures (Feng et al., 2007) :

- 1) β -sheet A regroupant les feuillets β 1, β 2 et β 11
- 2) β -sheet B regroupant les feuillets β 3, β 4, β 10 et β 9 et une courte hélice α 1
- 3) β -sheet C regroupant les feuillets β 5 et β 6 connecté par une longue boucle flexible
- 4) β -sheet D regroupant les feuillets β 7 et β 8 ainsi que les deux longues hélices α 2 et α 3 en parallèle opposé formant une épingle connecté par une courte boucle.

Le domaine β -sheet A regroupant la partie C-terminal et N-terminal de la protéine forme avec le domaine β -sheet B un « barrel » (Fig. 34).

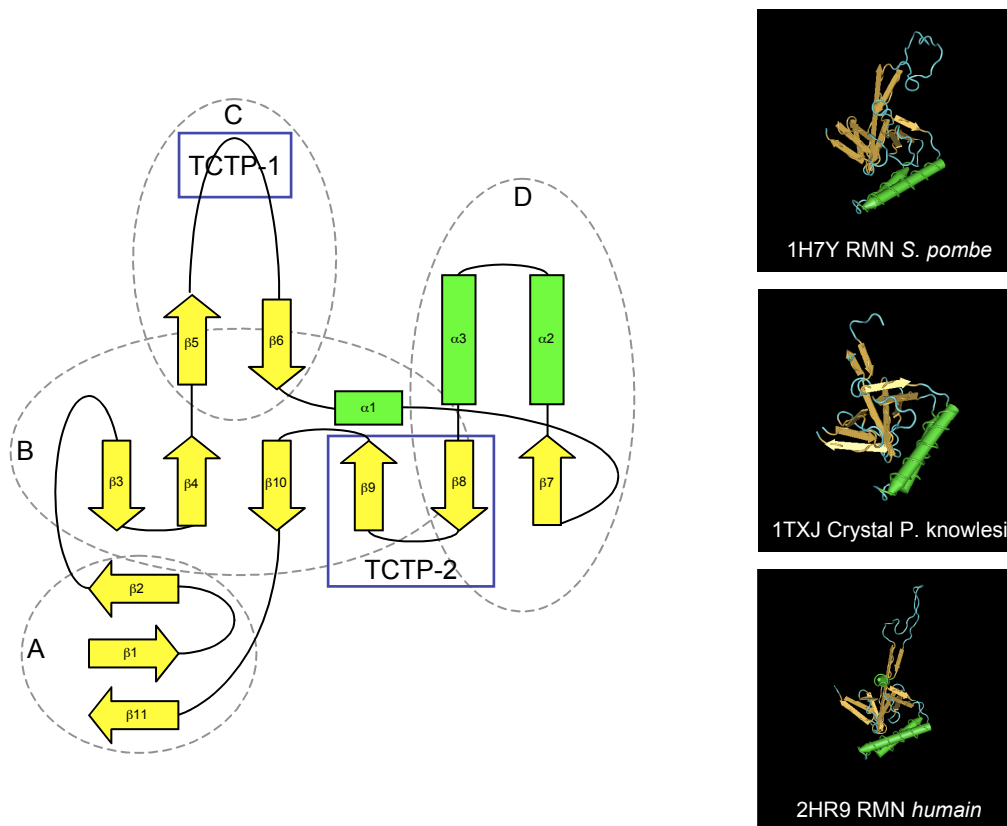


Figure 34 : Représentation schématique de la structure 3D de TCTP.

Les quatre domaines (β -sheet) décrits précédemment sont entourés en gris et annotés A, B, C et D. Les deux signatures TCTP-1 et TCTP-2 sont encadrées en bleu.

Modifications post-traductionnelles

Plusieurs sites pour des modifications post-traductionnelles ont été trouvés par l'utilisation de logiciels de prédiction comme des sites de phosphorylation, des sites de N-Myristylation ou des sites de N-Glycosylation (Blom et al., 2004) (Fig. 35). Ces sites de modifications post-traductionnelles pourraient être impliqués dans la fonction de la protéine.

Une étude a confirmé des sites de phosphorylation sur la protéine TCTP. Les résidus S46 et S64 seraient phosphorylés par la kinase PLK-1 durant la mitose et permettraient le détachement de la protéine TCTP des μ -tubules durant la transition métaphase-anaphase (Yarm et al., 2002). Une analyse globale de la phosphorylation du protéome par une technique récente de spectrométrie de masse (méthode de transfert d'électrons par dissociation : ETD : electron transfert dissociation) a mis en évidence la phosphorylation de la protéine TCTP sur la Sérine 46 dans les cellules 293T (Molina et al., 2007). Très récemment, un groupe ayant produit de la protéine PLK-1 dans *E. coli* a testé l'efficacité de PLK-1 sur la phosphorylation de TCTP. Il confirme que le résidu S46 peut être phosphorylé par PLK-1 mais pas le résidu S64 (Johnson et al., 2008). Ces résultats ne sont pas tout à fait en contradiction avec les travaux de Yarm. En 2002, ces auteurs ont montré qu'il y avait une hiérarchie dans la phosphorylation, le résidu S64 ne peut être phosphorylé sans la phosphorylation du résidu S46. Enfin une comparaison des consensus montre que le

consensus autour du résidu S46 est un site parfait [IDDSL] alors que le consensus autour du résidu S64 l'est beaucoup moins [GTESTV] ; ce qui pourrait expliquer la discordance des résultats.

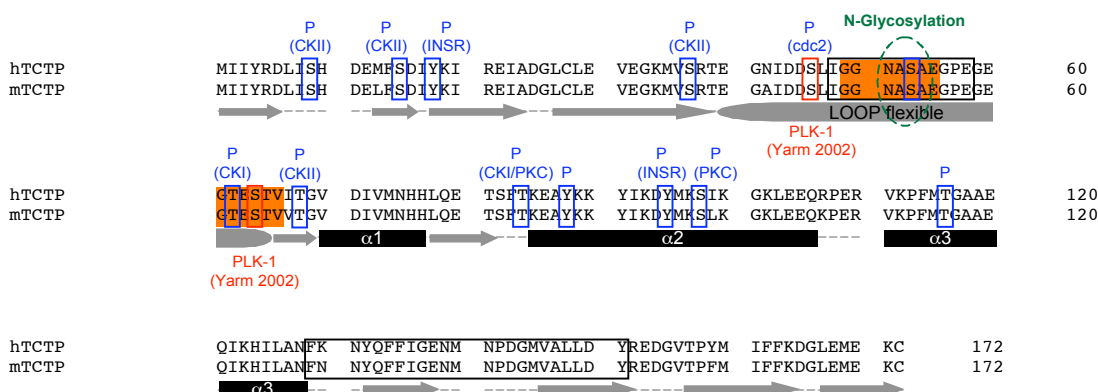


Figure 35 : Les différentes modifications post-traductionnelles prédites ou identifiées.

Prédiction de sites de phosphorylations avec les programmes *NetPhos*, *NetPhosK* & *ScanProsite* (encadré en bleu) : *Cdc2/CDK1*: Cyclin Dependant Kinase 1, *CKI*: Casein Kinase 1, *CKII*: Casein Kinase 2, *PKC*: Protein Kinase C, *INSR*: Insulin Receptor Kinase. Sites de phosphorylation identifiés par Yarm en 2002 (encadré en rouge) : *PLK-1*: Polo Like Kinase-1. Deux sites de *N*-Myristylation (surligné en orange) et un site de *N*-Glycosylation (entouré en vert) prédits par *Prosite*.

Régulation de TCTP

La protéine TCTP a d'abord été identifiée dans des cellules cancéreuses issues de nombreux tissus comme les cellules issues de leucémie érythrocytaire ou de cancer du sein ou de la prostate (Yenofsky et al., 1983) (Chitpatima et al., 1988) (Gross et al., 1989) (Li, Zhang et al., 2001) (Arcuri et al., 2004). Mais TCTP est également exprimée dans toutes les cellules non-cancéreuses comme les érythrocytes, les cellules issues de glandes mammaires, de testicules, de la prostate à l'exception des cellules de reins (Sanchez et al., 1997) (Bini et al., 1997) (Sturzenhaum et al., 1998) (Chung et al., 2000) (Thiele et al., 2000) (Guillaume et al., 2001) (Bommer et al., 2004) (Lee et al., 2004).

D'une façon générale, la protéine TCTP est plus exprimée dans les cellules issues de tissus de tumeurs en comparaison aux cellules issues de tissus sains (Vercouter-Edouart et al., 2001) (Tuynder et al., 2002). Le niveau d'expression de TCTP varie en fonction du type de cellule. La protéine est plus exprimée dans les tissus à forte activité mitotique alors qu'elle est faiblement exprimée dans les tissus où l'activité mitotique est faible comme le cerveau (Bohm et al., 1989). Le niveau d'expression de TCTP dépend aussi de l'état de différenciation de la cellule (Yan et al., 2000) (Gnanasekar et al., 2002) (Rao et al., 2002) (Arcuri et al., 2005).

Au cours de la phase exponentielle de croissance de *Saccharomyces Cerevisiae*, la protéine TCTP est exprimée à 100000 copies/cellule en comparaison à l'ACTINE qui n'est exprimée qu'à seulement 60000 copies/cellule (Norbeck et al., 1997). Ces données classent TCTP parmi les 20 protéines les plus exprimées et indiquent son rôle probable dans la croissance cellulaire (Thomas et al., 1981) (Thomas et al., 1986) (Benndorf et al., 1988). Des études systématiques de l'expression des gènes dans différents tissus ont classé le gène *tpt1* parmi les 50 ARNm les plus transcrits parmi 84103 gènes uniques de 19 tissus sains ou malades/cancers ou parmi les 10 gènes les plus exprimés parmi 1753 bibliothèques de tissus

différents (Velculescu et al., 1999) (Thompson et al., 2002). Le gène *tpt1* fait également parti des 1000 gènes qui sont transcrits ubiquitairement dans toutes les cellules.

Tpt1/TCTP est régulé au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau traductionnel (Yenofsky et al., 1982) (Bohm et al., 1989) (Xu et al., 1999) (Schmidt et al., 2007). L'expression de TCTP varie en réponse à de nombreux signaux extracellulaires comme les signaux de stress, de croissance, d'apoptose, certaines cytokines ou certains facteurs spécifiques.

Régulation transcriptionnelle

La transcription de TCTP est inhibée dans la levure suite à une privation en ammonium ou dans d'autres conditions de stress comme l'excès de sel (NaCl ou KCl), l'éthanol, le stress oxydatif (DTT) ou la chaleur (Bonnet et al., 2000). Inversement un stress osmotique (sucrose) induit une augmentation de la transcription de TCTP. La transcription du gène *tpt1* est également induite par différents composés chimiques comme le PMA (Phorbol ester) et le LPS (Lipopolysaccharides) dans les macrophages, la forskolin, la cisplatine, l'etoposide, la dioxine ou les métaux lourds comme le plomb, le zinc, le cadmium, le nickel, le cobalt ou le cuivre (Walsh et al., 1995) (Andree et al., 2006) (Sinha et al., 2000) (Oikawa et al., 2002) (Sturzenbaum et al., 1998) (Schmidt et al., 2007). La transcription du gène *tpt1* est induite chez le parasite *Trichinella spiralis* dans des conditions de stress (Mak et al., 2001) (Mak et al., 2007). TCTP est régulée par le calcium au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel suggérant un rôle pour TCTP dans l'homéostasie intracellulaire du calcium (Xu et al., 1999).

Régulation traductionnelle

La traduction rapide de la protéine TCTP est régulée par l'intermédiaire d'un stockage des ARNm de *tpt1*. Les ARNm sont stockés sous la forme d'ARNm non traductibles dans des polysomes et lors de signaux mitotiques, la synthèse de TCTP est faite rapidement par utilisation des stocks d'ARNm (Yenofsky et al., 1983) (Chitpatima et al., 1988) (Bohm et al., 1989). La proportion d'ARNm de *tpt1* engagée dans la traduction est largement inhibée après exposition des cellules au DMSO alors que la transcription n'est pas touchée provoquant une accumulation dans le cytoplasme d'ARNm non traduits. La synthèse de la protéine TCTP est régulée via les sites poly-pyrimidines situés dans la partie non transcrite 3'UTR de l'ARNm (Kruys et al., 1987) (Gross et al., 1989) (Bohm et al., 1991) (Bommer et al., 1994). Dans les mélanomes, le niveau d'expression de TCTP corrèle avec le développement de leur résistance aux drogues (Sinha et al., 2000).

La synthèse de TCTP est rapidement induite après la stimulation de la croissance des cellules de mammifères (Thomas et al., 1981) (Thomas et al., 1986) (Benndorf et al., 1988) (Bommer et al., 1994) (Vercoutter Edouart et al., 2001). C'est une des premières protéines qui a été identifiée comme induite par des signaux mitotiques dans les cellules tumorales ascites Erlich (Bohm et al., 1989). La synthèse de TCTP est également induite lors de la stimulation des macrophages par le PMA, le LPS et l'INTERFERON- γ , l'augmentation de la concentration en calcium dans le cytoplasme, les métaux lourds, et en réponse à l'induction de l'apoptose (Walsh et al., 1995) (Xu et al., 1999) (Sturzenbaum et al., 1998) (Schmidt et al., 2007) (Baudet et al., 1998).

Fonction intracellulaire de TCTP

Le rôle de TCTP n'est pas clair, mais l'étude de ces partenaires moléculaires dans la cellule nous éclaire un peu plus sur sa fonction. Les ligands de TCTP sont variés et suggèrent qu'au

niveau intracellulaire TCTP pourrait avoir plusieurs fonctions complémentaires comme une fonction dans la régulation du cycle cellulaire et la synthèse des protéines grâce à ces partenaires μ -tubules, PLK1 et les facteurs d'élongation eEF1A et eEF1B β , une fonction dans la régulation de l'apoptose avec ces partenaires MCL-1 et BCL-xL ou encore un maintien de l'homéostasie par la régulation de l'activité de la pompe à Na⁺ et K⁺.

Rôle dans l'homéostasie de la cellule

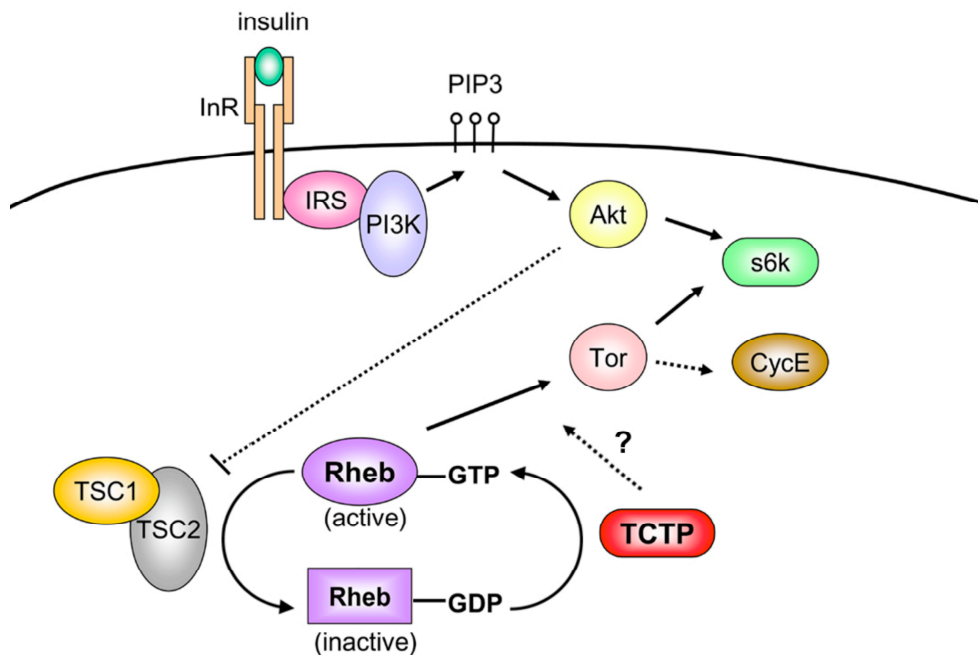
TCTP pourrait avoir un rôle dans l'homéostasie cellulaire grâce à son interaction avec la partie catalytique α de la protéine Na,K-ATPase (Jung et al., 2004). Cette protéine ou pompe à Na⁺ et K⁺ est une protéine à multi-domaines membranaires responsable du maintien de la concentration élevée en K⁺ et faible en Na⁺ à l'intérieur de la cellule. Cette stabilité ionique est nécessaire au contrôle du volume de la cellule, au maintien du potentiel de membrane, au transport des nutriments et est critique pour la prolifération, la différenciation cellulaire et la survie de la cellule. La surexpression de TCTP dans les cellules Hela inhibe l'activité de la protéine Na,K-ATPase de façon dose dépendante mais n'affecte pas la quantité d'ARNm ou de protéine. La partie N-terminale de TCTP correspondant aux résidus de 102 à 172 serait nécessaire à l'interaction avec la Na,K-ATPase. TCTP se lie également à la protéine SNX6 (Sorting Nexin 6) qui inhibe l'effet de TCTP sur la Na,K-ATPase (Yoon et al., 2006). SNX6 serait un régulateur négatif de TCTP dans la régulation de l'activité de la pompe à Na⁺ et K⁺.

Régulation du cycle cellulaire

Le site de liaison pour les μ -tubules a d'abord été trouvé par analyse informatique comparative. La région basique de la protéine TCTP (résidus 79 à 123) montre 46% d'homologie avec le domaine de liaison à la tubuline des protéines qui lient la tubuline MAP-1B (Gachet et al., 1999). *In vitro* puis *in vivo*, ces auteurs ont montré que dans des cellules de mammifère, TCTP se lie de manière dynamique aux μ -tubules pendant le cycle cellulaire formant les fuseaux mitotiques. La protéine TCTP reste liée aux μ -tubules pendant les phases G1-S-G2 et au début de la phase M jusqu'à la métaphase. Au cours de la transition métaphase-anaphase, la protéine TCTP se détache des μ -tubules (Gachet et al., 1997). Ces auteurs ont noté également que la surexpression de TCTP dans des cellules, induit la stabilisation des μ -tubules en provoquant un retard de croissance et en altérant la morphologie des cellules.

Ces résultats sont argumentés par une publication de 2004 qui montre que la protéine TCTP se lie à la protéine PLK-1 et que la phosphorylation de TCTP sur les résidus Serine 46 et 64 par PLK-1 provoque son détachement des μ -tubules au cours de la métaphase (Yarm et al., 2002). La PLK-1 est une kinase impliquée dans la formation du fuseau mitotique durant la mitose. La surexpression de TCTP mutée pour ces deux résidus S46A et S64A montre un phénotype associé à des mitoses catastrophiques comme des cellules poly-nucléaires et « rounded » avec des chromatines condensées. Tout cela corrèle et met en évidence que TCTP pourrait être un substrat important de la kinase PLK-1 lors de la progression du cycle cellulaire durant l'anaphase.

Une étude récente montre que TCTP se lie à la protéine RHEB (**R**as **H**omolog **E**nriched in **B**rain) chez la *Drosophila* (Hsu et al., 2007) (**Fig. 36**). C'est une GTPase de la superfamille RAS et un ligand direct de TSC2 (Tuberous Sclerosis 2). RHEB est un régulateur positif de mTOR en participant à la phosphorylation de la p70S6k et de la 4E-BP1 et un gène suppresseur de tumeur mutés dans de nombreux cancers. Selon l'hypothèse de ce groupe, TCTP contrôlerait la croissance et la prolifération cellulaire par la régulation positive de RHEB. TCTP serait une GEF et favoriserait la forme GTP active de RHEB.



(D'après Hsu et al., 2007)

Figure 36 : Hypothèse sur le rôle de TCTP dans la voie de signalisation InR/TSC.

(InR : Insulin Receptor) (TSC : Tuberos Sclerosis)

Synthèse des protéines

Les protéines eEF1A et eEF1B β se lient également à TCTP. Ces protéines sont impliquées dans l'étape d'élongation de la synthèse protéique (Cans et al., 2003) (Langdon et al., 2004). La protéine eEF1A est une protéine G qui recrute les acides aminés chargés sur l'ARNt. Elle est active sous sa forme GTP et se lie à l'ARNt-aminoacyl. Une fois placé sur le ribosome, le GTP s'hydrolyse et eEF1A-GDP est relarguée. L'activité d'eEF1A est restaurée par les facteurs d'échange de guanine (GEF). La protéine eEF1B β remplace le GDP par le GTP. Il a été montré que TCTP stabilise la forme GDP de la protéine eEF1A et qu'elle inhibe l'activité GEF d'eEF1B β . Ces résultats sont en faveur d'une activité inhibitrice de dissociation de GDP (GDI) par TCTP.

Régulation de l'apoptose

Depuis plus de 15 ans, la protéine TCTP issue de différentes espèces est décrite comme une protéine liant le calcium (Haghighat et al., 1992) (Sanchez et al., 1997) (Bhisutthibhan et al., 1999) (Xu et al., 1999) (Kim et al., 2000) (Gnanasekar et al., 2002) (Rao et al., 2002) (Arcuri et al., 2004) (Arcuri et al., 2005) (Bangrak et al., 2004) (Mulenga et al., 2005) (Feng et al., 2007) (Graidist et al., 2007). À l'exception de quelques expériences, c'est la technique du Ca²⁺ overlay assay qui a permis aux chercheurs de déterminer si TCTP liait le calcium (Garrigos et al., 1991). Plusieurs auteurs ont essayé de localiser la région de TCTP qui lie le calcium par différentes méthodes comme le Ca²⁺ overlay assay, la RMN, la dialyse, les mutations ponctuelles ou les délétions partielles mais les résultats divergent d'une publication à l'autre (**Fig. 37**). Selon les méthodes utilisées, la constante de dissociation pour la liaison du calcium sur la protéine TCTP varie également de 0,022M à 10 μ M. Comme d'autres protéines

qui sont capables de lier le calcium, la protéine TCTP est très stable à 100°C pendant 15 minutes.

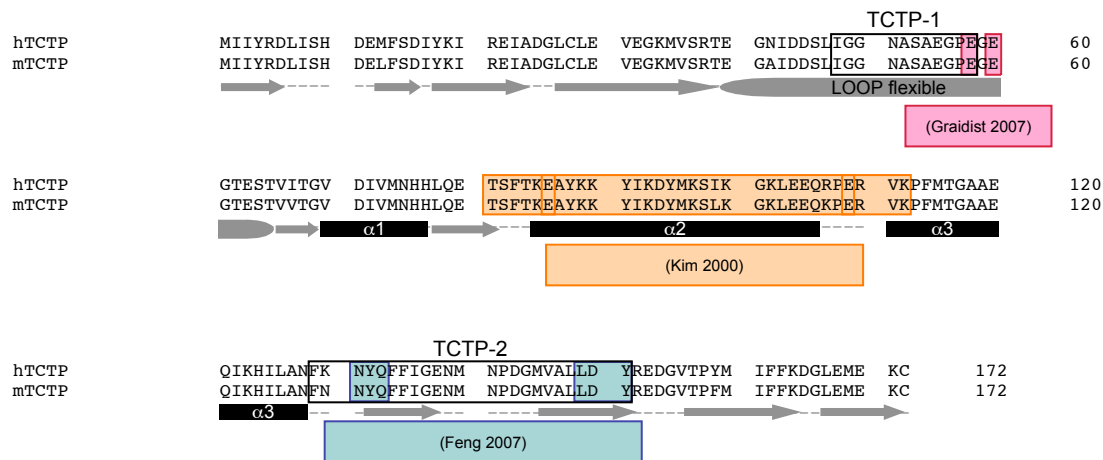


Figure 37 : Bilan des différents sites de liaison au calcium identifiés dans la littérature.

Le site de liaison au calcium de TCTP ne ressemble, a priori, à aucun site de liaison au calcium connu comme un motif EF-hand ou un domaine CaLB (Calcium-Binding-related domain) (Kim et al., 2000). Jusqu'à récemment, aucune fonction claire liée à la liaison au calcium n'avait encore été décrite à l'exception de quelques travaux. Certains auteurs ont avancé que TCTP était régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par le calcium (Xu et al., 1999). Une déplétion de calcium dans le RE induisait une augmentation de l'ARNm alors qu'une augmentation du calcium dans le cytoplasme induisait une augmentation de l'expression de la protéine. Dans d'autres études, les auteurs ont montré que l'expression de TCTP localisée au niveau du cytoplasme des cellules du trophoblaste augmentait au cours de la gestation et que la délétion de TCTP par l'utilisation de siRNA entraînait un déficit dans la distribution du calcium dans le placenta (Arcuri et al., 2005).

Ce n'est quand 2007 qu'un groupe publie une relation entre la liaison du calcium sur la protéine TCTP et la protection de la cellule contre l'apoptose (Graidist et al., 2007). En absence de TCTP par l'utilisation de siRNA ou dans des MEFs hétérozygotes, la concentration en calcium libre augmente beaucoup plus suite à l'inactivation des pompes SERCA par le thapsigargin sur les cellules U2OS. Cette augmentation en calcium libre est accompagnée d'une augmentation de l'apoptose, une augmentation du EthD-1 index (representing the late phase of apoptosis or necrosis) et une augmentation de l'activation des Caspases 3. Les auteurs ont identifié les résidus Glu58 et Glu60 comme indispensables pour la liaison du calcium sur TCTP. On peut noter que ces deux résidus E58 et E60 sont localisés dans la boucle flexible de TCTP.

Plusieurs études ont montré le rôle anti-apoptotique de TCTP et son importance cellulaire. D'une part, la surexpression de TCTP protège la cellule de l'apoptose induite par différents stimuli et d'autre part la déplétion de TCTP provoque la mort de la cellule par apoptose (Li, Zhang et al., 2001) (Liu et al., 2005) (Yang et al., 2005) (Tuynder et al., 2002) (Graidist et al., 2004). L'interaction de TCTP avec des protéines anti-apoptotiques comme MCL-1 ou BCL-xL conforte dans ce sens.

MCL-1 a été identifiée dans les ML1 (Myeloid Leukemia cells) stimulées par le phorbol-ester. Comme TCTP, MCL-1 est une protéine anti-apoptotique capable d'inhiber l'apoptose induite par différents composants comme l'etoposide, la staurosporine, les UV, le calcium ionophore A23187 et la surexpression de C-Myc. La déplétion de MCL-1 par antisense provoque une mort rapide des cellules lorsqu'elles sont traitées par le phorbol-ester (Zhang et al., 2002). Le rôle de TCTP sur la stabilisation de MCL-1 ou la stabilisation de MCL-1 par TCTP est à l'heure actuelle sujette à discussion. Pour le groupe de Fujise, MCL-1 a un rôle de chaperone sur TCTP. La baisse de l'expression de MCL-1 par utilisation de siRNA provoque la baisse d'expression de TCTP alors qu'inversement la diminution de TCTP par siRNA n'a aucun impact sur l'expression de MCL-1. Alors que pour le groupe de Yang-Yen, TCTP se lie à MCL-1 et module son effet anti-apoptotique et sa stabilité (Liu et al., 2005). Les auteurs montrent que la surexpression de TCTP bloque l'ubiquitination de MCL-1 et sa dégradation par le protéasome. Le groupe de Fujise publie également que ces deux protéines anti-apoptotiques qui interagissent ensemble peuvent inhiber l'effet cytotoxique du 5-Fluorouracil indépendamment l'une de l'autre (Graidist et al., 2004).

La protéine BCL-xL est une des cinq isoformes de BCL-x et c'est la forme dominante anti-apoptotique qui est impliquée dans la prévention du relargage de CYT-C en maintenant l'intégrité de la membrane des mitochondries. Pour assurer cette fonction BCL-xL doit être associée à la membrane mitochondriale. Des expériences d'immunofluorescences montrent que les protéines BCL-xL et TCTP endogènes sont colocalisées dans le cytosol et les mitochondries des cellules Hela. TCTP ne contient pas de domaine TM permettant une liaison avec la membrane et il a besoin d'une autre protéine comme BCL-xL par exemple pour se lier à la mitochondrie. La protéine TCTP lie la protéine BCL-xL par sa partie N-terminale et plus particulièrement les résidus 20 à 27 [IREIADGL] (Yang et al., 2005). Ils montrent également que la partie N-terminale de TCTP est nécessaire pour la fonction anti-apoptotique de TCTP.

Fonction extracellulaire de TCTP

TCTP a des fonctions à l'intérieur de la cellule mais aussi à l'extérieur. TCTP a d'abord été identifié dans le surnageant des cellules tumorales U937 comme étant capable d'induire la sécrétion d'histamine (MacDonald et al., 1995). Cette protéine est impliquée dans des réponses inflammatoires et allergiques. La protéine TCTP ne contient aucun peptide-signal dans sa séquence et jusqu'en 2004 aucune donnée ne nous permettait de savoir comment TCTP pouvait sortir de la cellule pour agir à l'extérieur. L'autre question est par quel récepteur TCTP peut induire la sécrétion d'histamine.

En 1995, le groupe de Susan MacDonald attribue à TCTP des nouvelles fonctions de cytokines. Ils ont découvert que TCTP présent dans le surnageant des cellules tumorales U937 pouvait stimuler la sécrétion d'histamine de basophiles isolés d'individus allergiques en présence d'IgE (Immunoglobine E) et ont renommé TCTP : HRF pour « Histamine-Releasing Factor ». TCTP induit la sécrétion d'histamine également des éosinophiles et des mastocytes. Ils montrent que la libération de l'histamine par les cellules basophiles, implique TCTP dans la phase tardive de réaction (LPR) de l'allergie pathologique. Cette activité est confirmée par l'utilisation de TCTP extrait de plusieurs types d'échantillons comme les fluides biologiques de différents patients, le surnageant de cellules en culture ou directement par la protéine recombinante. En plus de l'histamine, les basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes T stimulés par TCTP sécrètent aussi des cytokines : IL-4, IL-8 et IL-13 de manière IgE dépendante ou non (Schroeder et al., 1996) (Schroeder et al., 1997) (Teshima et al., 1998) (Vonakis et al., 2003) (Wantke et al., 1999) (Bommer et al., 2004). TCTP isolée à partir de

surnageants de cellules murines d'érythro-leucémie, a montré que cette dernière peut se lier aux cellules B, induire la production de cytokines et stimuler leur croissance (Kang et al., 2001). Récemment il a été montré que TCTP peut stimuler la production par les cellules épithéliales bronchiales d'IL-8 et GM-CSF (Yoneda et al., 2004). Le groupe de Lee a montré l'interaction entre TCTP et la chaîne légère de la Myosine (Myosin Light Chain) protéine qui est associée à la sécrétion d'histamine dans les cellules RBL-2H3 (Kim et al., 2001). TCTP est également retrouvée dans le plasma des hôtes infectés par les parasites *Plasmodium falciparum* et *Schistosoma mansoni* (MacDonald et al., 2001) (Rao et al., 2002). Cette protéine est capable d'induire une réponse inflammatoire des éosinophiles. L'artémisinine, une drogue utilisée pour le traitement de la malaria pour les malades résistants aux autres traitements comme la chloroquine et le sulphadoxinepyriméthamine, se lie à la protéine TCTP du parasite *Plasmodium falciparum* (Bhisutthibhan et al., 1998). Cette drogue active également l'expression de TCTP en corrélation avec la résistance à ces drogues. L'interaction entre l'artémisinine et la protéine TCTP n'est pas responsable de l'activité anti-malaria de cette drogue (Eckstein-ludwig et al., 2003). On peut noter que les dérivés de l'artémisinine inhibent la croissance des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogénèse *in vitro* (Chen et al., 2003).

Comment TCTP sort de la cellule ?

Notre équipe a d'abord montré que les lignées cellulaires 293T, K562 et HepG2 sécrètent du TCTP et que cette sécrétion est insensible à la BFA et à la Monensin, deux inhibiteurs de la voie de sécrétion classique RE/Golgi (Amzallag et al., 2004). Par différentes expériences, nous avons ensuite montré que TCTP se lie à la protéine TSAP6, une protéine à 6 domaines membranaires appartenant à la famille des STEAPs, elles-mêmes impliquées dans des voies de sécrétions. Par exploration des différentes voies de sécrétion insensibles aux inhibiteurs BFA et Monensin, la protéine TCTP a été trouvée dans des petites vésicules appelées exosomes et sécrétée par une voie non-classique. La surexpression de TSAP6 dans les cellules induit une augmentation de la sécrétion de TCTP par ces vésicules. Ces résultats pour TCTP sont cohérents avec les données qu'on peut trouver pour d'autres protéines comme Galectin-3 qui sont sécrétées par les voies non-classiques et qui ont des fonctions à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.

Quel pourrait être le récepteur à TCTP sur les cellules ?

Le groupe de MacDonald a publié très récemment une ébauche de la voie de transduction activée par TCTP dans les basophiles humains (Vonakis et al., 2008). Le groupe montre que tous les basophiles peuvent fixer TCTP et que TCTP induit chez les basophiles des donneurs qui répondent à la stimulation de TCTP en sécrétant de l'histamine une phosphorylation des protéines SYK, AKT, MEK et ERK. Au contraire les basophiles des donneurs qui ne répondent pas à l'activation de TCTP ne montrent pas de phosphorylation de ces mêmes protéines.

TCTP dans les modèles animaux

L'utilisation d'ARN interférence dans deux modèles animaux : *Caenorhabditis elegans* et la *Drosophila* montre que la diminution du niveau d'expression de TCTP (ou F25H2.11 sur le Chr.1 chez *C. elegans*) entraîne un ralentissement de la croissance (Kamath et al., 2003) (Hsu et al., 2007). Dans ces deux cas, la diminution de TCTP par l'utilisation d'ARN interférence n'est pas létale pour l'animal. La délétion du gène *tpt1* chez la *Drosophila* provoque une forte létalité et les animaux qui échappent à la mort sont plus petits avec des cellules plus petites mais également moins nombreuses. Une communication personnel de Gachet indique

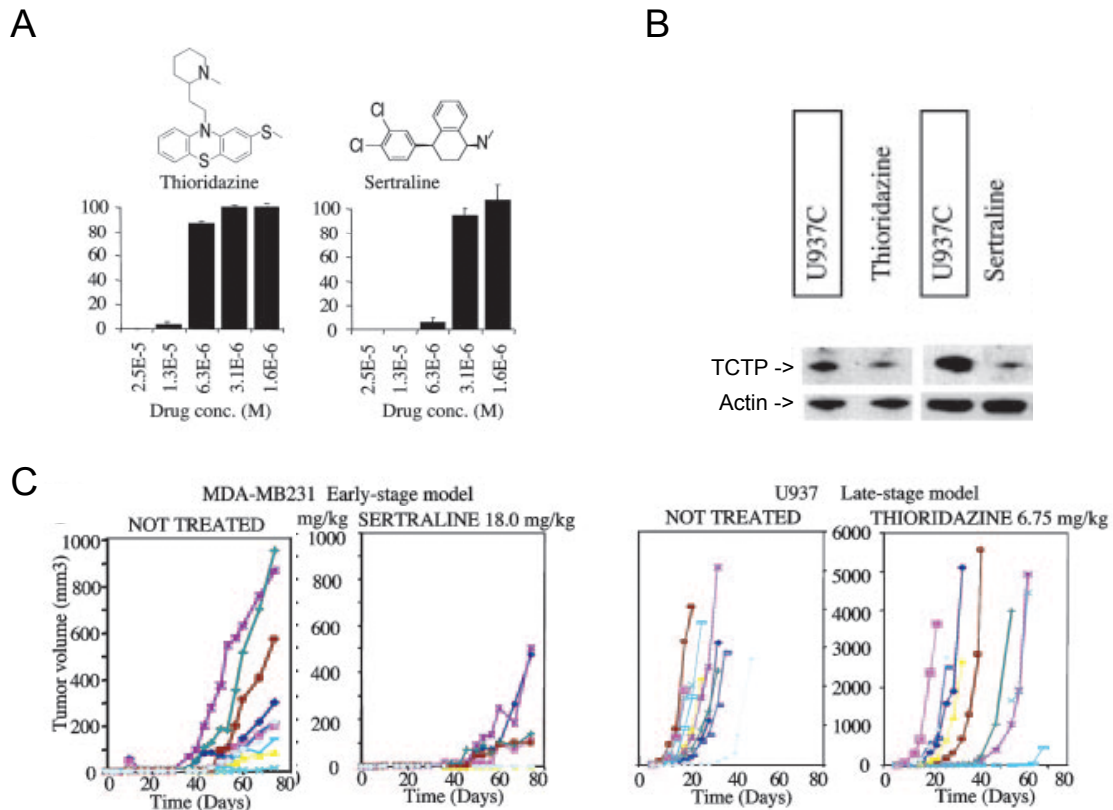
également que la délétion du gène *tpt1* dans la levure induit un défaut dans l'entrée du cycle cellulaire. Ces premières constatations sur des modèles animaux laissent à penser que la protéine TCTP intervient dans la croissance cellulaire. Dernièrement, le groupe de Yang-Yen publie le phénotype de souris knockout pour le gène *tpt1*. La délétion de *tpt1* dans ce modèle animal provoque une mort embryonnaire dès le 6,5^{ème} jour du développement par apoptose (Chen et al., 2007). Une étude approfondie de l'embryogenèse montre que TCTP est exprimée à la fois dans les tissus de l'embryon et les tissus extra-embryonnaires et qu'au 5,5^{ème} jour du développement embryonnaire, il y a moins de cellules dans l'épiblaste chez les animaux KO comparé aux animaux WT. Dans des souris transgéniques, la surexpression de TCTP induit une hypertension artérielle par répression de la pompe Na,K-ATPase (Kim et al., 2008).

TCTP nouvelle cible contre le cancer

Les précédents résultats montrent que TCTP a un rôle dans l'état cancéreux de la cellule, qu'il participe même à sa tumorigénicité. Des expériences avec des siRNA ou des antisense montrent que si l'on supprime l'expression de TCTP dans des cellules tumorales celles-ci perdent de leur phénotype malin.

Donc, l'idée de l'approche pharmacologique a été de trouver des drogues dont le rôle est de diminuer l'expression de TCTP dans les cellules. Pour se faire on s'est basé sur le fait que TCTP induit la sécrétion d'histamine et l'on a regardé l'effet sur des cellules cancéreuses de certains anti-histaminiques qui sont utilisés dans le traitement d'états allergiques pour lesquels l'histamine joue un rôle médiateur. Les anti-histaminiques antagonistes des récepteurs H1 comme l'Hydroxyzine (dérivé des piperazines) et la Prométhazine (dérivé des phénothiazines) ainsi que des composés ayant des structures similaires des anti-histaminiques comme la Sertraline et la Thioridazine induisent la mort des cellules cancéreuses (Tuynder et al., 2004) ([Annexe 5](#)) (**Fig. 38**).

Ces drogues inhibent également la formation de tumeurs dans les souris *scid/scid* et réduisent le niveau de TCTP. La Sertraline est un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine qui est utilisée comme anti-dépresseur (Guthrie et al., 1991) (De Vane et al., 2002). La Thioridazine est un dérivé des phénothiazines. Un antagoniste des récepteurs à la dopamine D2 utilisé comme antipsychotiques et inhibiteurs des canaux calciques. Il a déjà été montré que les phénothiazines ont un effet cytotoxique sur des lignées tumorales humaines MCF-7 et MDA-MB en induisant l'apoptose (Zhelev et al., 2003) (Strobl et al., 1992) (Gil-ad et al., 2006). Cette diminution de TCTP n'est pas un effet anti-prolifératif généralisé. Au contraire, l'incubation des cellules avec les drogues induit une augmentation de la transcription de *tpt1* certainement pour compenser la baisse dans la cellule. Il a aussi été montré que la Sertraline stimule l'expression de CREB, un facteur de transcription de TCTP (Nibuya et al., 1996).



(D'après Tuynder et al., 2004)

Figure 38 : Effet des drogues sur les cellules cancéreuses et sur l'expression de TCTP.

A : Viabilité des cellules U937 incubées avec une concentration croissante de drogues. **B** : analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP dans les cellules incubées avec les drogues. **C** : Formation de tumeurs in vivo dans des souris scid/scid traitées avec les drogues.

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure si ces drogues agissent directement ou indirectement sur TCTP mais elles ont un effet cytotoxique sur des cellules cancéreuses et mimant le processus de la réversion tumorale en réduisant le niveau de TCTP.

La protéine TCTP est une protéine multi-fonction qui a un rôle au niveau intra-cellulaire mais également au niveau extra-cellulaire comme d'autres protéines sécrétées par les voies non-classiques (**Fig. 39**).

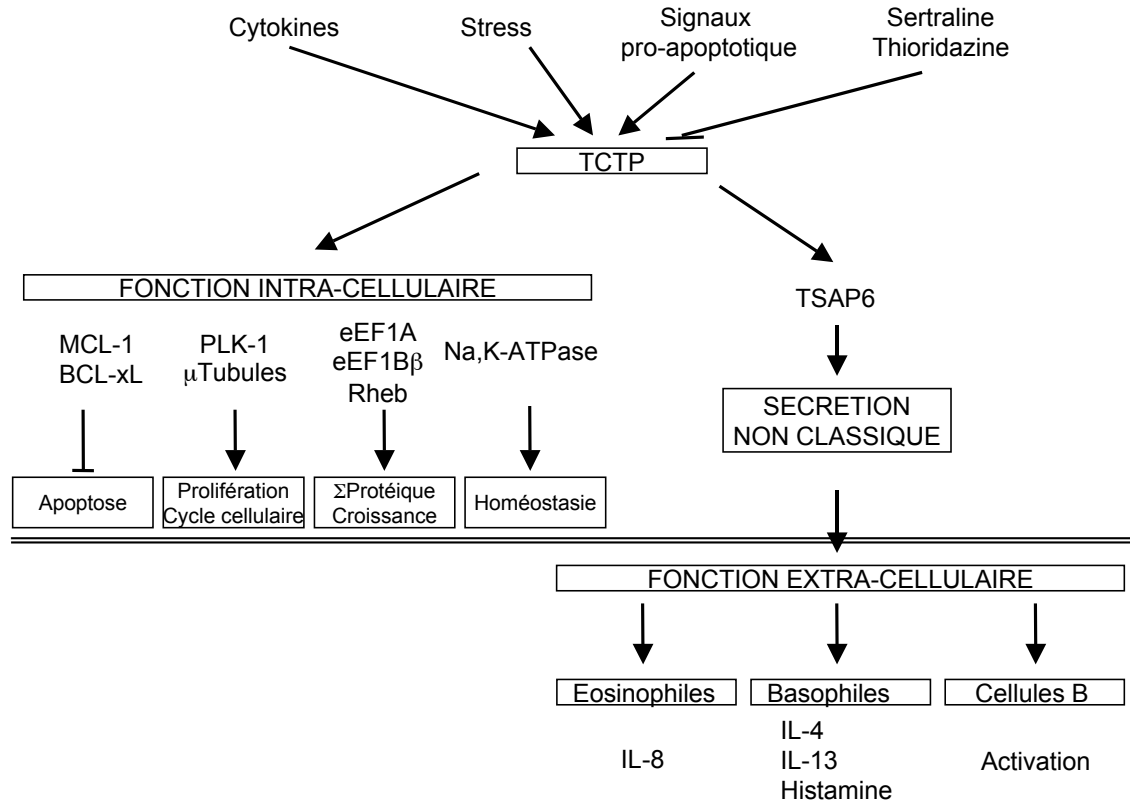


Figure 39 : Récapitulatif sur les connaissances de TCTP.

TCTP est régulée par de nombreux facteurs et nous avons montré que certaines drogues comme la Sertraline et Thioridazine peuvent moduler son expression. La fonction intra-cellulaire de TCTP dépend de la protéine avec laquelle elle va se lier.

De plus, cette protéine est fortement exprimée dans les tissus issus de cancer et sa suppression par siRNA induit la diminution du phénotype tumoral des cellules.

5 - APPROCHE EXPERIMENTALE

Depuis plus de cent ans, la souris s'est imposé comme un modèle pour l'étude de la génétique des mammifères. Elle est à la base d'un nombre important d'avancées scientifiques. C'est en se basant sur les grandes découvertes de ces 100 dernières années que les chercheurs ont développé ces animaux génétiquement modifiés afin de réaliser des études expérimentales répondant à des problématiques biologiques variées. Des expériences similaires peuvent être et sont réalisées sur d'autres animaux comme la mouche (*Drosophila melanogaster*) ou le ver de terre (*Caenorhabditis Elegans*).

La souris est un mammifère de petite taille. Le cycle de développement de cet animal est court, 9 semaines en moyenne sont nécessaires pour atteindre la maturité sexuelle de l'animal. De plus leurs capacités de reproduction sont extraordinaires, chaque femelle peut donner naissance de 15 à 150 souriceaux par an.

Malgré un ancêtre commun il y a plus de 70 millions d'années, la souris a un génome proche de celui de l'homme. Alors que la séquence initiale du génome humain est publiée en février 2001, ce n'est qu'en décembre 2002 que la même revue publie l'article annonçant le séquençage du génome de la souris (Lander et al., 2001) (Waterston et al., 2002).

En attendant de comprendre la fonction physiologique de tous les gènes, la comparaison de séquences des deux génomes de l'homme et de la souris ont déjà apporté plusieurs indications intéressantes.

- 1) Le génome de la souris (2,5Gb) est plus petit de 14% que celui de l'homme (2,9Gb).
- 2) 90 % du génome humain et 93% du génome murin sont inclus dans des segments de synténie conservée entre les deux espèces (dans ces régions l'organisation et l'ordre des gènes sont conservés).
- 3) Les deux génomes contiennent environ 30000 gènes pouvant être traduits en protéines.
- 4) 80 % des gènes murins ont leurs orthologues chez l'homme.
- 5) Seulement 1% des gènes murins n'ont pas d'homologues chez l'homme.
- 6) Certains gènes impliqués dans la reproduction, l'immunité et les sens olfactifs ont fait l'objet d'expansions locales chez la souris. C'est-à-dire que dans cette espèce, des gènes paralogues sont apparus. Ceci pourrait expliquer par exemple la plus forte sensibilité olfactive des souris comparé à l'homme.

Les souris tolèrent la consanguinité sur plusieurs générations. Les lignées consanguines sont obtenues en croisant de façon ininterrompue pendant au moins 20 générations des frères et sœurs jusqu'à obtenir des animaux génétiquement identiques à chaque locus. Tous les descendants qui suivront seront nécessairement homozygotes pour tous les allèles fixés. Par comparaison les vrais jumeaux (monozygote) sont génétiquement identiques, mais ils sont hétérozygotes à de nombreux locus de leur génome. L'intérêt majeur de ces lignées consanguines génétiquement identiques et homozygotes à tous les locus est la reproductibilité des résultats et la possibilité d'effectuer des mesures. Ces lignées permettent d'étudier les effets d'une mutation ou d'une délétion de gène dans un fond génétique déterminé par la lignée utilisée. En effet, la mutation ou la délétion est la seule différence entre la lignée d'origine (lignée sauvage) et la lignée génétiquement modifiée. On peut alors comparer directement les phénotypes des individus porteurs des allèles sauvages et mutés puisque tous les autres allèles du génome sont identiques entre les deux groupes. Mais les lignées d'origine

consanguines ont quelques inconvénients qui peuvent poser problèmes lors de leur utilisation. Elles sont généralement peu fertiles comparées aux souris d'origine et ne sont pas représentatives d'une population naturelle puisqu'elles sont génétiquement identiques et certains phénotypes observés sur ces lignées peuvent s'avérer être faux et liés essentiellement au fond génétique et non à la modification génétique. C'est pour cette raison que les généticiens ont également développé des lignées non consanguines en laboratoire. Le principe des colonies non-consanguines est d'obtenir une lignée où tous les animaux ont une hétérogénéité génétique constante. La principale difficulté pour maintenir cette lignée est de maintenir constante cette fréquence d'hétérogénéité. Ceci implique au sein d'un laboratoire d'utiliser un grand nombre d'animaux et de mettre en place des plans d'accouplements afin d'éviter l'accouplement d'animaux apparentés ou l'accouplement avec un géniteur étranger qui pourrait perturber la fréquence d'hétérogénéité. Les individus d'une telle colonie sont tous génétiquement différents et représentent un meilleur modèle proche de l'hétérogénéité génétique des populations naturelles. L'intérêt de travailler sur ce type de lignée est de prendre en compte la diversité génétique rencontrée dans une population et de s'affranchir des observations erronées faites sur un fond génétique spécifique d'une lignée.

Les scientifiques ont une connaissance très approfondie du développement embryonnaire et ont la possibilité de manipuler l'embryon *in vitro*. Les souris sont fertiles à partir de la neuvième semaine et ceci jusqu'à l'âge de 14 mois en moyenne. Une femelle est féconde environ tous les 4 jours (durée de son cycle œstral) et peut donc avoir 10 portées en moyenne au cours de sa période de fertilité, chacune durant une vingtaine de jours selon le genre. Le développement embryonnaire se déroule en deux étapes : le développement pré-implantatoire qui dure 4 jours et durant lesquels l'embryon n'a aucun contact avec l'utérus, ce qui permettra une manipulation *in vitro* et le développement post-implantatoire durant lequel l'embryon va pouvoir se développer et suivre le cours de sa gestation.

Les souris transgéniques

Les deux modèles les plus répandus sont d'une part les souris mutées au hasard obtenues suite à une exposition à un produit chimique ou un rayonnement et d'autre part les souris mutées de façon très spécifique suite à l'intégration d'une séquence d'ADN exogène dans le génome de la souris. Lors d'expériences de mutations au hasard on parle de « Génétique classique » (du phénotype vers le gène) mais il est également possible de choisir le gène cible est d'étudier le phénotype suite à une activation, on parle alors de « Génétique inverse » (du gène vers le phénotype).

Basée sur les travaux effectués sur la levure pendant les années 1970, la recombinaison homologue a été mise en évidence en 1980 chez les mammifères par injection directe d'ADN dans des cellules de mammifères. À la différence de la recombinaison illégitime ou non-homologue où un fragment d'ADN s'intègre au hasard à la faveur d'une cassure double-brin dans le génome d'une cellule, la recombinaison homologue implique la reconnaissance d'homologie entre l'ADN exogène transfecté et le locus cible. Il s'agit d'un échange de fragments d'ADN entre deux molécules d'ADN au niveau des séquences nucléotidiques homologues. C'est ce qu'il se passe lors de crossing-over à la méiose entre les chromatides des paires de chromosomes.

Knockout et knock-in de gène

Le knockout d'un gène signifie la perte physique de la séquence (ou d'une partie de la séquence) de ce gène conduisant à l'absence de l'ARN messager et donc de la protéine. Le knock-in d'un gène signifie la modification de la séquence d'un gène conduisant à la transcription d'un ARN messager et à la traduction d'une protéine mutée. La méthode consiste à injecter un ADN exogène contenant deux zones d'homologies ainsi que les modifications que l'on veut intégrer dans le génome directement dans des cellules. Par recombinaison homologue, la construction va s'insérer dans le génome de la souris au locus désiré. La première utilisation de cette technique est la délétion d'un gène, mais il est également possible d'intégrer des mutations ponctuelles dans le génome d'une souris à un locus précis.

Conditional Knockout de gène

Dans certaines conditions, la perte de fonction d'un gène dans l'ensemble des cellules de l'animal entraîne un phénotype complexe et ne permet pas d'obtenir clairement la fonction du gène correspondant. Dans d'autres conditions, cela entraîne une létalité embryonnaire. Pour parer ces inconvénients, il est possible de générer des souris conditional knockout (cKO). Ces cKO se font de la même manière que les souris KO sur la base de la recombinaison homologue, mais dans la construction nous insérons un système *Cre/LoxP* permettant de supprimer la fonction de notre gène d'intérêt *in vivo* seulement dans un tissu spécifique et/ou à un moment voulu.

Système Cre/loxP

La recombinaise Cre, reconnaît une séquence spécifique *loxP* de 34pb (**ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**) présente dans le génome du bactériophage P1. Cette séquence comprend deux motifs inversés de 13pb de part et d'autre d'une séquence de 8pb qui donne au site *loxP* son orientation. La recombinaise Cre catalyse la recombinaison conservatrice réciproque entre deux sites *loxP* (**Fig. 40**). Lorsque ces deux sites *loxP* sont orientés dans le même sens, la recombinaison induit la délétion du fragment d'ADN contenu entre les deux sites. En cas d'orientation en sens inverse, la recombinaison induit l'inversion du fragment d'ADN compris entre ces deux sites. Pour être active chez la souris, la recombinaise Cre doit être localisée dans le noyau des cellules de mammifères.

Ce système permet d'étudier la perte de fonction de n'importe quel gène dans n'importe quel tissu à condition d'avoir la lignée de souris transgénique qui exprime la recombinaise Cre dans le tissu en question. À ce jour, il est possible d'étudier la délétion d'un gène dans de nombreux types cellulaires comme les cellules de l'épiderme, les cellules du cerveau, les cellules du muscle squelettique ou du muscle lisse, les cellules germinales mâles, les hépatocytes, les adipocytes... (Metzger et al., 1999) (Dworniczak et al., 2007).

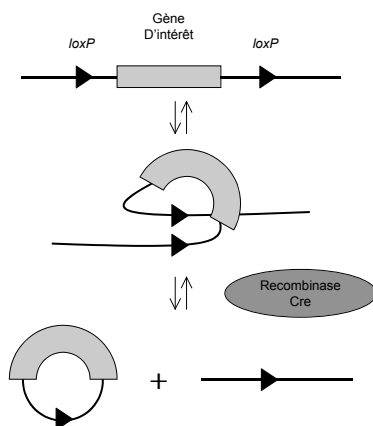


Figure 40 : Principe de la réaction catalysée par la recombinaise Cre.

Excision du fragment d'ADN compris entre les deux séquences loxP orientées dans le même sens.

Ce système *Cre/loxP* peut également être utilisé pour d'autres applications comme déclencher l'expression d'un transgène dans des cellules filles, supprimer les cassettes de sélection Neo^R dans les knockout ou les knock-in ou encore induire des translocations chromosomiques.

Les différentes étapes pour générer des souris transgéniques

La construction qui va servir de base pour la recombinaison homologue doit contenir tout d'abord deux zones d'homologie avec le locus cible encadrant la séquence d'intérêt pour permettre la recombinaison de la construction dans le génome de la souris. Elle doit également contenir une cassette de résistance à un antibiotique (Neo^R) permettant la sélection des clones recombinés. Ensuite, chaque construction est différente selon la modification que l'on veut générer chez l'animal (**Fig. 41**).

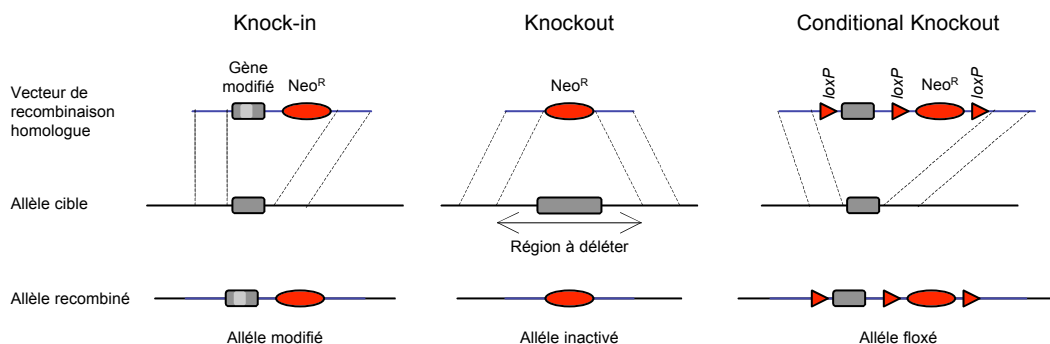


Figure 41 : Les principaux types de vecteurs de recombinaison homologue.

S'il s'agit d'un knock-in de gène, le vecteur comprend le gène endogène muté à l'exigence de l'expérimentateur ainsi que la cassette de sélection Neo^R entre les deux zones d'homologie. S'il s'agit d'une expérience de knockout de gène, entre les deux zones d'homologie, on ne place que la cassette de sélection Neo^R , au cours de la recombinaison la cassette Neo^R remplacera le gène d'intérêt que l'on souhaite supprimer. Dans le cas d'un conditional knockout, dans la construction, on maintient à l'identique la séquence du gène endogène (ou une partie) à laquelle on rajoute la cassette de résistance Neo^R ainsi que les deux zones d'homologie. On rajoute ensuite à cette construction des sites loxP de part et d'autre de la région à exclure au moment voulu ainsi que des sites loxP de part et d'autre du gène de résistance à la néomycine pour exclure la cassette de résistance après sélection des clones recombinés. Les mécanismes moléculaires de recombinaison homologue chez les mammifères sont mal connus, mais plusieurs facteurs comme le locus cible, la longueur de la zone d'homologie (environ 3kb de chaque côté) et l'exactitude à la base près entre la construction et le locus (utiliser de l'ADN issu du même génome que les cellules ES) peuvent jouer sur le succès de la recombinaison homologue.

Formation des cellules ES

Les expériences de mutation ou d'inactivation de gènes dans la souris sont réalisées dans les cellules de l'embryon appelées également cellules ES correspondant à la masse cellulaire interne du blastocyste. Pendant la phase pré-implantatoire du développement embryonnaire, l'embryon n'est pas implanté sur la paroi de l'utérus, il est donc possible de récupérer le blastocyste, en extraire les cellules ES, les maintenir en culture, les manipuler *in vitro* avant

de les réintroduire dans le blastocyste et de replacer celui-ci dans l'utérus des souris. Ces cellules ES extraites du blastocyste sont totipotentes. Elles ont la potentialité de fournir dans leur descendance tous les types cellulaires de l'organisme. Elles ont aussi la particularité d'auto-renouvellement et de prolifération. La construction linéaire est introduite par électroporation dans des cellules ES dérivées de la lignée de souris 129/Sv. Un jour après l'électroporation, ces cellules sont cultivées en présence de l'antibiotique de sélection (G418 dans notre cas) afin de supprimer les cellules qui n'ont pas reçu le vecteur. Les cellules résistantes au G418 sont ensuite criblées par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou Southern-Blot afin de déterminer quelles cellules ont subi une recombinaison homologue totale au locus cible. À ce stade, un aliquot des suspensions cellulaires est congelée afin de conserver les clones. Après ce criblage, les clones identifiés comme portant la mutation *in vitro* sont utilisés afin de générer des souris transgéniques.

Formation des souris chimères

Les cellules ES sont capables de fournir dans leur descendance tous les types cellulaires de l'organisme ainsi que la lignée germinale, mais elles n'ont pas le pouvoir organisateur de l'œuf au stade-1. Pour cette raison, les cellules ES recombinées sont micro-injectées dans la cavité (blastocèle) des blastocystes avant d'être replacées dans l'utérus de la femelle pseudo-gestante, c'est-à-dire préparée à recevoir l'embryon. Pour cela les femelles sont accouplées avec des mâles ayant subi une vasectomie afin de déclencher et maintenir une sécrétion de progestérone indispensable à l'implantation de l'embryon dans l'utérus. Les cellules ES recombinées sont micro-injectées dans la cavité (blastocèle) des blastocystes de lignée C57BL/6. Ces blastocystes C57BL/6 contenant des cellules ES 129/Sv recombinées sont ensuite transférés dans l'utérus de femelles C57BL/6 receveuses pseudo gestantes. Les souris de la lignée 129/Sv dont dérivent les cellules ES ont un pelage agouti (poils noirs avec une bande subapicale jaune), les souris de la lignée C57BL/6 dont dérivent les blastocystes ont un pelage noir uniformes. Les souriceaux issus de l'association de cellules ES 129/Sv recombinées et de blastocystes d'origine C57BL/6 ont un pelage bigarré. Ils sont à la fois agoutis et noirs, ce sont des souriceaux chimères. Certains tissus proviennent des cellules ES et d'autres dérivent du blastocyste hôte. La contribution des cellules ES génétiquement modifiées à un individu chimère est évaluée par un examen direct de la coloration du pelage, plus le pelage est *agouti*, plus il y a colonisation par la cellule ES.

Génération de la lignée

Sur l'ensemble des souriceaux chimères, seules les souris chimères dont les cellules ES génétiquement modifiées ont colonisé la lignée germinale vont transmettre la construction à leur descendance. Les individus bigarrés mâles, au pelage le plus *agouti*, sont accouplés avec des femelles sauvages C57BL/6. Deux types de souriceaux vont naître de ce croisement, des individus au pelage noir et des individus au pelage *agouti* portant la construction à l'état hétérozygote. Ces individus hétérozygotes au pelage *agouti* sont ensuite croisés entre eux afin d'obtenir des individus de trois génotypes. On parle alors de croisement Intercross, les descendants de ce type de croisement se répartissent dans les proportions mendéliennes : 25% d'homozygote pour l'allèle sauvage (+/+), 25% d'homozygote pour l'allèle modifié (-/-) et 50% d'hétérozygotes (+/-). La lignée sera maintenue par croisement Intercross pendant toute l'étude. Par cette méthode, ce sont des souris knockout ou knock-in pour un gène qui sont générées, c'est-à-dire que les embryons issus du croisement d'une souris chimère mâle avec une femelle sauvage C57BL/6 portent déjà la modification à l'état hétérozygote. Si cette modification est létale sur le développement de l'embryon sous une forme récessive, nous

n'obtiendrons jamais de souriceaux viables hétérozygotes et si elle est létale sous une forme dominante ce sont des animaux homozygotes que nous n'obtiendrons jamais. Pour cette raison et pour d'autres, les généticiens ont développé une méthode de conditional knockout de gène.

Les cKO

Comme nous l'avons vu précédemment, la construction comporte la séquence endogène contenant le gène (ou une partie seulement), deux zones d'homologie de part et d'autre ainsi que la cassette de résistance à la néomycine et de courtes séquences appelées *loxP* réparties de part et d'autre des fragments de la construction que l'on veut supprimer comme le gène ou la cassette de résistance Neo^R . Comme pour générer des knockout de gène classique, la construction linéaire est électroporée dans des cellules ES pour obtenir des cellules ES recombinées. Avant d'injecter ces cellules ES génétiquement modifiées dans les blastocystes hôtes, ces cellules sont transfectées avec un vecteur exprimant la recombinase Cre afin de supprimer la cassette Neo^R avant d'implanter ces cellules dans l'animal (**Fig. 42**). Par criblage par PCR ou Southern-Blot les clones ayant conservé le gène d'intérêt et ayant perdu la résistance à la néomycine sont sélectionnés pour générer des souris transgéniques homozygotes (*loxP/loxP*) de la même manière que précédemment. À ce stade les souris homozygotes obtenues ont le même génome que des souris sauvages à l'exception de 2 cassettes *loxP* placées de part et d'autre de la séquence que l'on veut éliminer.

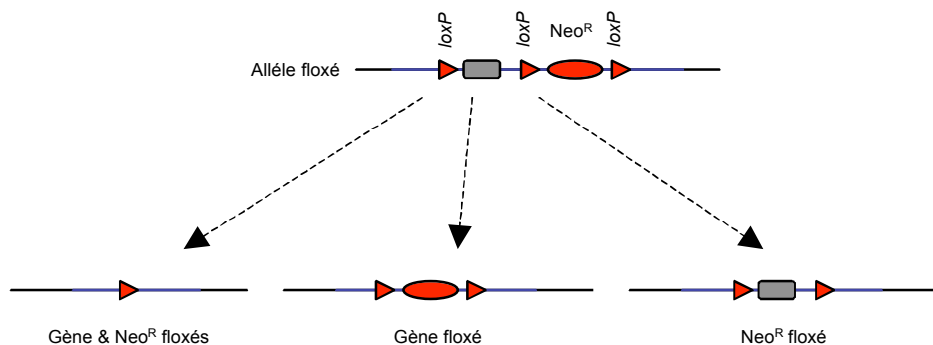


Figure 42 : Elimination de la cassette de résistance Neo^R .

En fonction des sites *loxP* impliqués dans la recombinaison, trois formes alléliques peuvent être produites 1) délétion de la totalité du fragment d'ADN compris entre les deux sites *loxP* situés aux extrémités de la construction, 2) délétion du gène d'intérêt 3) délétion de la cassette de résistance Neo^R . C'est cette dernière construction que l'on souhaite transmettre.

Afin de supprimer un gène (ou une partie seulement) dans un organe ou un type cellulaire spécifique, ce système nécessite la fabrication d'une deuxième lignée (Cre/Cre) exprimant la recombinase Cre dans ce tissu ou ce type cellulaire particulier. Il s'agit ensuite de croiser ces deux lignées afin d'obtenir des souris hétérozygotes pour la construction (*loxP/+*) et pour la recombinase Cre (Cre/+). Pour obtenir les animaux qui nous intéressent, il suffit de croiser les souris hétérozygotes (*loxP/+ ; Cre/+*) avec des souris homozygotes pour la construction (*loxP/loxP*). Le phénotype des animaux (*loxP/loxP ; Cre/+*) qui n'expriment plus notre gène d'intérêt seulement dans le tissu où s'exprime la recombinase Cre et finalement comparé à celui des animaux de référence de génotype (*loxP/loxP ; +/+*).

6 - RESULTATS

Comme je viens de le présenter, de nombreuses études ont déjà été faites sur les protéines TCTP et TSAP6. Mais malgré toutes ces études, la compréhension des fonctions principales de ces protéines n'a été abordée que par la mise en œuvre de systèmes *in vitro* ou des modèles cellulaires. Ces études n'ont pas permis d'extrapoler leur fonction à l'organisme entier. Un système vivant ne se comporte pas comme un ensemble de cellules mais il est soumis à des facteurs environnementaux sous le contrôle de plusieurs systèmes comme le système nerveux ou le système hormonal. Un des moyens de comprendre la fonction de ces deux gènes *tctp* et *tsap6* c'est de supprimer leur expression *in vivo* afin d'étudier l'effet sur un système vivant et de comprendre l'importance de ces gènes dans le développement de l'animal et sa survie. Nous avons donc élaboré des souris génétiquement modifiées pour étudier la fonction de nos deux gènes. Nous supposons pour cela que les souris ayant perdu la fonction du gène présenteront un phénotype qui indiquera à quel stade, dans quel tissu ou organe et dans quelle circonstance la fonction du gène délété est importante. Pour parer les problèmes de létalité et s'affranchir de phénotypes complexes nous avons préféré la méthode de conditional knockout. Les constructions ont donc été élaborées selon le schéma vu précédemment (**Fig. 41**), mais lors de la génération des animaux nous avons mené de front les deux méthodes (KO et cKO) l'une étant plus rapide que l'autre (**Fig. 43**).

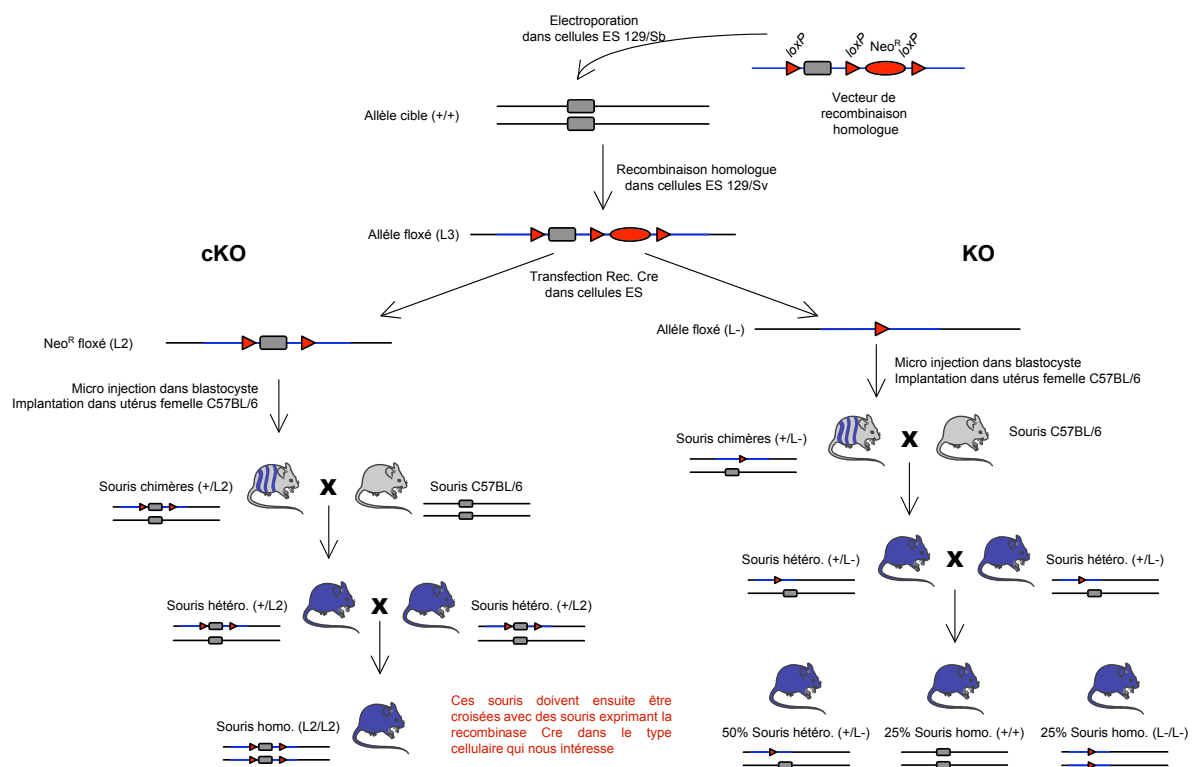


Figure 43 : Génération de souris KO vs cKO.

La même construction sert à générer deux types de souris, les KO et les cKO. La différence se fait au moment de la sélection des cellules ES à injecter dans les blastocystes après transfection de la Cre recombinase. Les allées floxées (L-) vont servir à la génération des KO alors que les allées floxées (L2) serviront à la génération des cKO.

Les souris cKO pour le gène *tsap6*

Le gène *TSAP6* est localisé sur le chromosome 1 chez la souris et son transcrite mesure 2719bp. Cette longueur de transcrite est assez longue et de plus, certains introns sont très longs ce qui empêche de supprimer la totalité du gène chez l'animal. Nous avons donc choisi de supprimer les exons 2 et 3 (les exons les plus longs) mais surtout l'exon 2 contenant l'ATG. La construction a été faite par PCR en utilisant une Taq polymérase très fidèle. Un fragment de 10,3kb d'ADN génomique a été amplifié sur le chromosome 1 et cloné dans le vecteur pBluescript (Fig. 44). Un site *loxP* est inséré en 5' de la zone à invalider au site unique de restriction *SpeI*, la cassette de résistance à la néomycine entourée par 2 sites *loxP* est insérée au site unique *XbaI* en 3' du fragment à supprimer. Cette construction linéarisée est ensuite utilisée pour générer les souris cKO pour le gène *TSAP6* selon le schéma classique décrit précédemment.

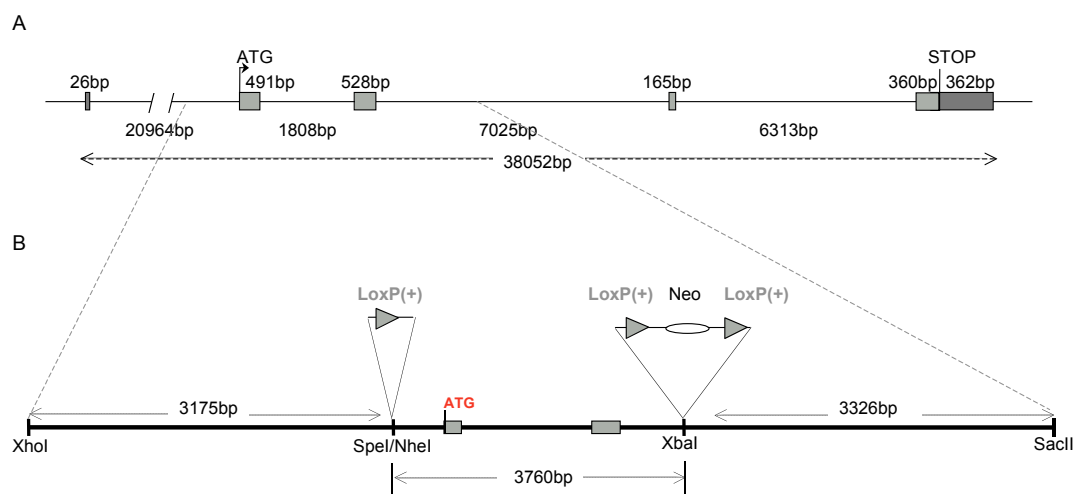


Figure 44 : Structure du gène *TSAP6* et construction pour générer les cKO.

NC_000067 *Mus musculus* chromosome 1, reference assembly (C57BL/6J). **A** : structure du gène *tsap6* selon le schéma classique intron/exon. Les exons codants sont représentés par des carrés gris, les non-codants par des carrés gris foncé. **B** : schéma de la construction clonée dans le vecteur pBluescript.

Les souris cKO pour le gène *tpt1*

La localisation et la description de la structure du gène *TCTP* chez la souris a fait l'objet d'une publication par notre équipe en 2003 (Fiucci et al., 2003) (Annexe 4). Comme chez le lapin et l'homme, le gène *tpt1* chez la souris a beaucoup de pseudogènes localisés sur différents chromosomes. Pour faire la construction pour les cKO pour ce gène, il a fallu d'abord identifier sur quel chromosome, le gène *tpt1* était localisé. Grâce aux bases informatiques, on a pu se rendre compte que les gènes *tpt1* sur le chromosome 6 et le chromosome 9 correspondaient parfaitement au cDNA de *TCTP* mais ne contenait pas d'introns alors que les homologues de *tpt1* dans d'autres espèces contenaient des introns et des exons. On avait également trouvé une partie des exons du gène *tpt1* entrecoupée d'introns sur le chromosome 14. On a donc étudié l'activité promotrice des régions en amont de ces trois gènes (Fig. 45).

Selon notre étude, le gène *TCTP* est localisé sur le chromosome 14 chez la souris, il contient 6 exons répartis sur 2,9kb et un poly (T) entre les exons 2 et 3. Ce poly (T) est certainement à

l'origine de son identification tardive sur le génome de la souris, c'est aussi ce qui a rendu la construction un peu difficile à réaliser (**Fig. 46**).

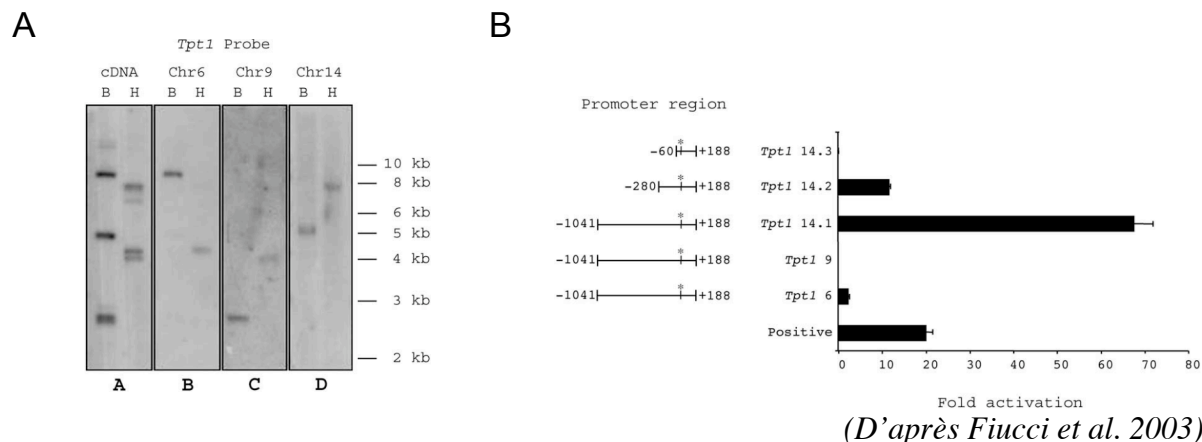


Figure 45 : Présence de pseudogènes pour tpt1 dans le génome de la souris.

A : Southern-Blot sur ADN génomique de souris avec le cDNA de TCTP comme sonde. **B** : activité promotrice des régions en amont du gène tpt1 sur le Chr. 6, 9 et 14.

A cause du poly (T) et pour pouvoir cloner 8,8kb d'ADN génomique, trois fragments ont été amplifiés sur le chromosome 14 par PCR puis clonés bout à bout dans le vecteur pBluescript. Notre objectif était de supprimer la totalité du transcrit vu sa petite taille, mais des problèmes d'inefficacité de recombinaison homologue, nous ont obligé à modifier à trois reprises cette construction pour supprimer finalement 3 exons, laissant intacte dans le génome l'exon contenant l'ATG et le suivant.

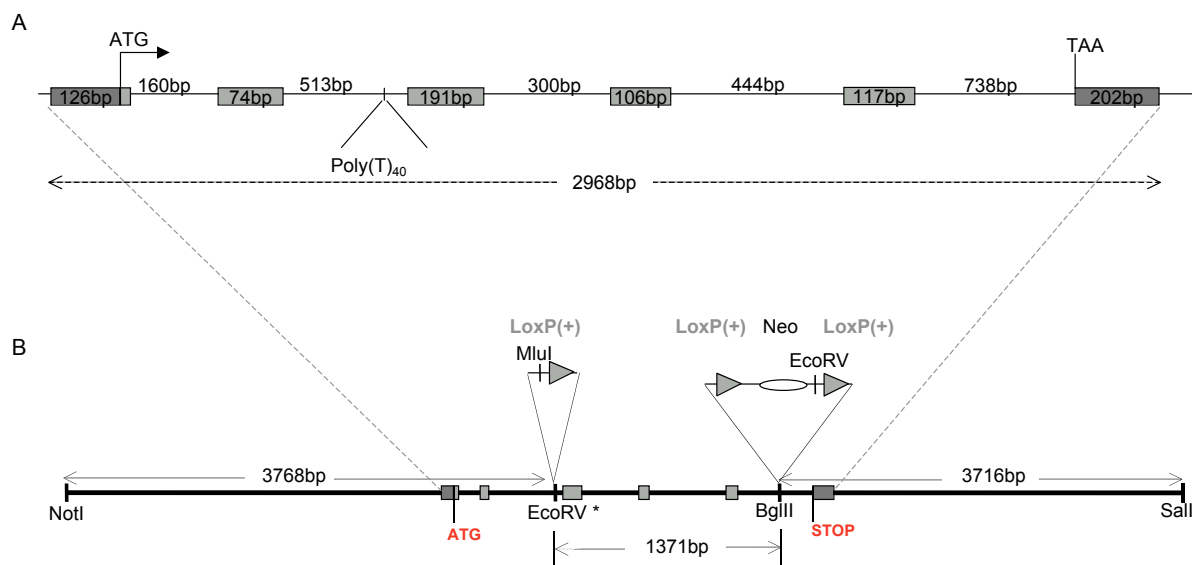


Figure 46 : Structure du gène TCTP et construction pour la génération des cKO.

NC_000080 *Mus musculus* chromosome 14, reference assembly (C57BL/6J). **A** : structure du gène tpt1 dans le génome de la souris. **B** : schéma de la construction clonée dans le vecteur pBluescript.

Un site *loxP* est inséré en 5' de l'exon 3 au site unique de restriction EcoRV (rajouté lors du clonage de la construction), la cassette de résistance à la néomycine entourée par 2 sites *loxP* est insérée en 3' de l'exon 5 au site unique de restriction BglII. Cette construction linéarisée est ensuite utilisée pour générer les souris cKO pour le gène TCTP.

ARTICLE 1.

La sécrétion des exosomes est compromise dans les souris knockout TSAP6

Afin de compléter l'étude fonctionnelle de la protéine pro-apoptotique TSAP6, en 2002 notre équipe a entrepris de générer des souris cKO pour ce gène et d'étudier l'effet de cette délétion chez l'animal. Cet article présente tout d'abord la caractérisation de la protéine TSAP6 chez la souris, la présentation du phénotype de ces souris cKO ainsi qu'un mécanisme pour expliquer ce phénotype et l'effet de cette délétion sur les voies de l'apoptose et la sécrétion des exosomes.

Caractérisation de la protéine murine TSAP6

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 donc entrepris de caractériser la protéine, son expression dans les tissus et sa localisation cellulaire chez la souris. Chez la souris, l'analyse de la protéine par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre le peptide (5'-MSGEMDKPLISRRLVSDGS-3') révèle deux bandes une forme d'environ 46 kDa et une autre d'environ 52 kDa comme chez l'humain (Passer et al., 2003) (Fig. 47 A & B). Dans la mesure où les analyses par Northern-Blot, ne montrent qu'une seule forme d'ARNm, on a émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir de modifications post-traductionnelles. La forme à 52 kDa migre sous la forme d'une bande diffuse qui apparaît être une particularité des protéines glycosylées. On a donc testé cette hypothèse en traitant les cellules avec de la Tunicamycine puis avec des inhibiteurs spécifiques des N-glycosylations et O-Glycosylation. Les résultats de ces expériences montrent que la forme qui migre à 52 kDa correspond à une forme N-glycosylée de la protéine TSAP6 (Fig. 47 C).

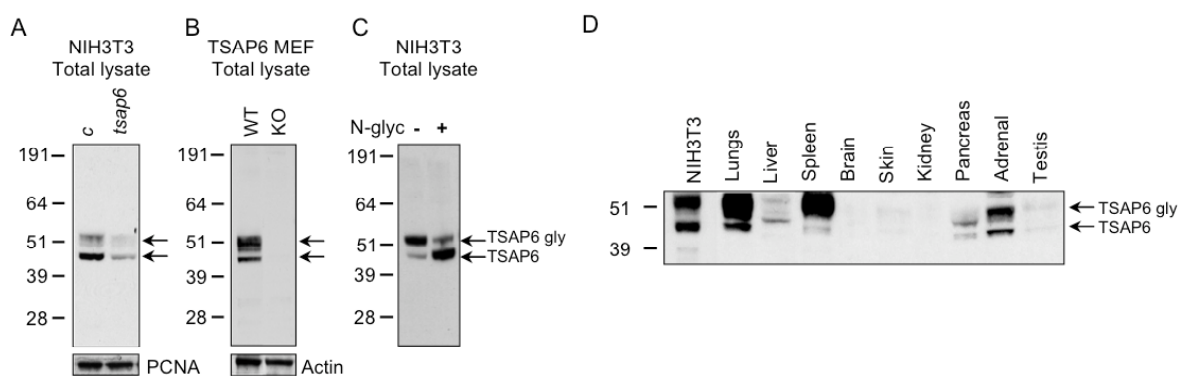


Figure 47 : caractérisation de la protéine murine TSAP6 par Western-Blot.

A et B : expression de TSAP6 dans plusieurs cellules: NIH3T3 et MEFs wt et ko pour le gène *tsap6*. **C :** effet de la tunicamycine sur la bande à 52kDa. **D :** caractérisation de TSAP6 dans les différents tissus murins.

Pour compléter cette caractérisation nous avons regardé l'expression de la protéine TSAP6 au niveau tissulaire par Western-Blot. On constate une forte expression de la protéine dans les

poumons, la rate, les glandes surrénales et le pancréas mais une expression plus faible dans le foie et le cœur (**Fig. 47 D**).

Par immunofluorescence, on a montré que la protéine TSAP6 endogène est colocalisée avec des protéines du Golgi comme la protéine GM130 et plus spécifiquement avec la protéine TGN38, un marqueur du TGN. La protéine TSAP6 est colocalisée également avec la protéine EEA1 un marqueur des endosomes précoces et le récepteur à la Transferrine (TF-R), un autre marqueur des endosomes. Cette caractérisation cellulaire de la protéine TSAP6 est vérifiée dans plusieurs types cellulaires et est cohérente avec la localisation cellulaire des autres membres de la famille STEAP et a été confirmée par microscopie électronique (**Fig. 48**). On montre également que la protéine TSAP6 est localisée à la membrane plasmique de certaines cellules.

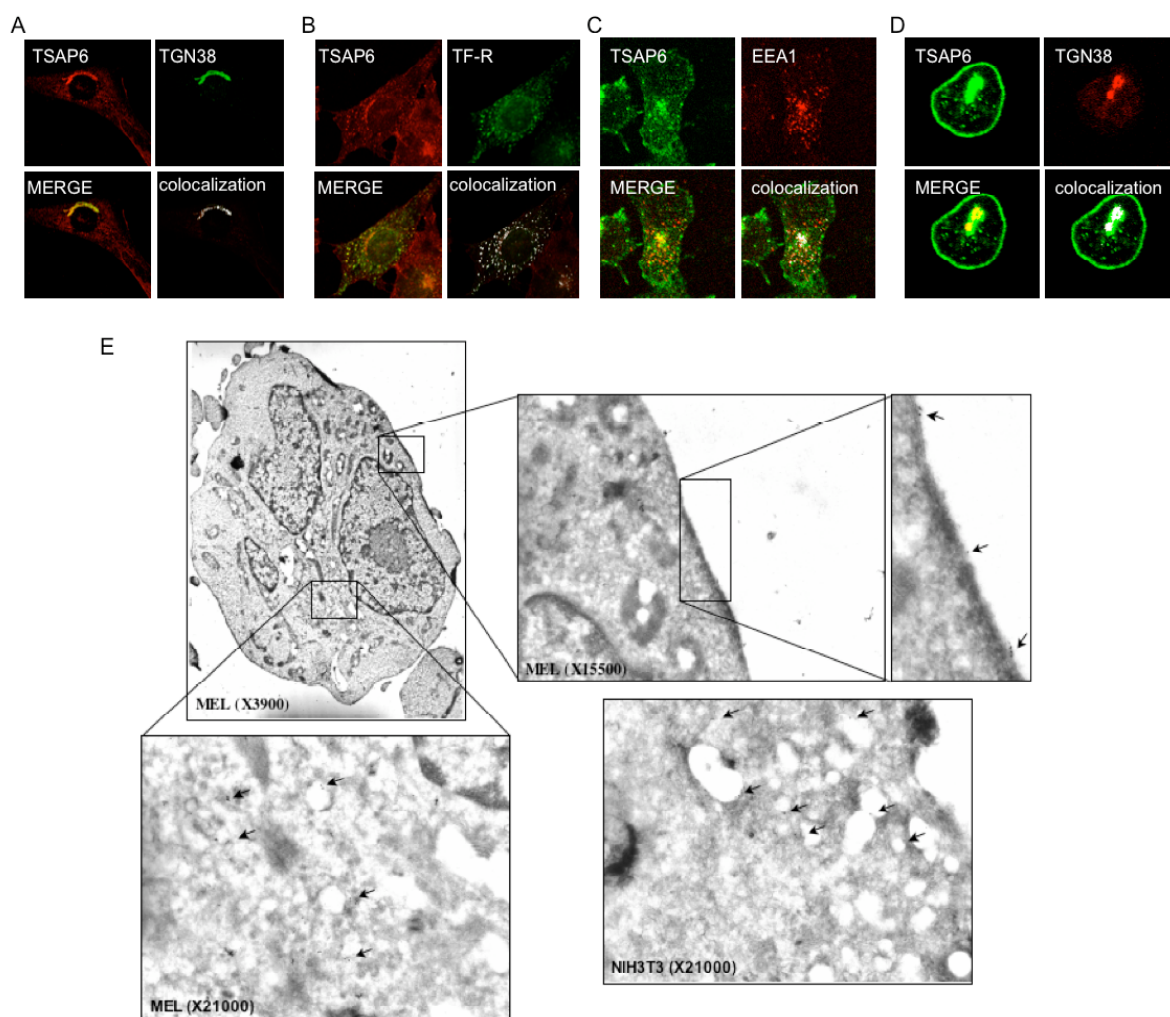


Figure 48 : localisation cellulaire de TSAP6.

A à D : Colocalisation de la protéine TSAP6 avec des marqueurs du Golgi (TGN38) et des endosomes (TF-R et EEA1) par immunofluorescence sur des MEFs (A et B), des NIH3T3(C) et des MEL (D). **E :** localisation de TSAP6 à la membrane des cellules et au niveau des vésicules de sécrétion et du Golgi dans des NIH3T3 et des MEL.

Phénotypes des souris knockout pour le gène TSAP6

Le phénotype principal de ces souris KO pour le gène *tsap6* est une anémie microcytaire hypochromique décrite précédemment par le groupe Fleming (Ohgami et al., 2005) (Ohgami et al., 2006). Cette anémie microcytaire est accompagnée d'une splénomégalie et l'étude microscopique de la rate montre une forte hématopoïèse extra-médullaire au niveau de la pulpe blanche ainsi que des précurseurs d'érythrocytes de taille variable au niveau de la pulpe rouge. Cette anémie microcytaire est accompagnée également d'un nombre élevé de plaquettes, de globules blancs et de globules rouges. Les globules rouges nombreux sont aussi de taille et de forme hétérogènes (Fig. 49).

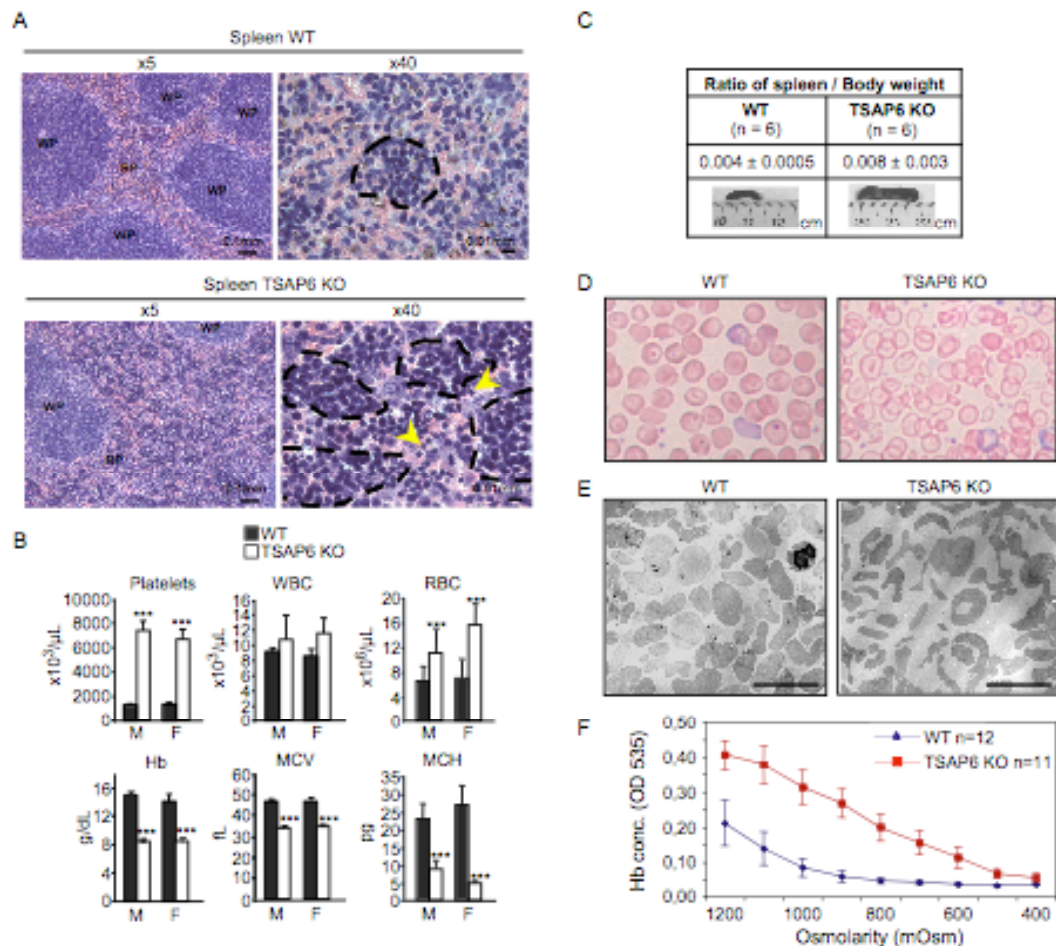


Figure 49 : Phénotype des souris KO pour le gène TSAP6.

A : coloration par hematoxylin-eosin de la rate. Les sites d'hématopoïèses extra-médullaires dans la pulpe blanche sont entourés par des traits en pointillés et les précurseurs érythrocytaires de tailles variables indiqués par des flèches jaunes (Pulpe blanche: WP; Pulpe rouge: RP). **B** : dosages des cellules sanguines : plaquettes (Platelets), cellules blanches (WBC), cellules rouges (RBC), hémoglobine (Hb), volume moyen des cellules (MCV) et concentration moyenne en hémoglobine (MCH). Ces résultats représentent une moyenne de 6 males et 6 femelles wt (barres noires) vs. 4 males et 6 femelles KO (barres blanches). * : statistiquement significatif ($p < 0.05$). **C** : moyenne du rapport du poids de la rate sur le poids de 6 animaux WT et 6 animaux KO. **D** : coloration au May-Grünwald-Giemsa de frottis sanguins d'animaux WT et KO. **E** : analyse par microscopie électronique d'érythrocytes d'animaux WT et KO. **F** : analyse de la fragilité osmotique des globules rouges d'animaux WT et KO.

Les anémies sont des affections caractérisées par une diminution en dessous des valeurs normales du nombre des érythrocytes et/ou du volume érythrocytaire (hématocrite) ce qui entraîne une diminution de la concentration d'hémoglobine dans le sang. Les causes des anémies peuvent être d'origine diverse : les insuffisances extra-médullaires par défaut de production de cellules souches hématopoïétiques médullaires ou par production de cellules anormales ; les anémies hémolytiques lorsque la durée de vie moyenne des globules rouges est raccourcie à cause d'un défaut dans la membrane, du système enzymatique, de la synthèse ou encore de la structure de l'hémoglobine ; les thalassémies résultantes d'une production insuffisante d'une ou de plusieurs chaînes de globine de configuration normale et les anémies ferriprives dues à un épuisement des réserves en fer. Souvent dues à une mauvaise nutrition, dans de rares cas, les anémies ferriprives peuvent s'expliquer par une malabsorption du fer ou par des pertes résultantes de saignements chroniques ou aigus.

En théorie, les anémies microcytaires hypochromes sont le plus souvent dues à une conséquence tardive d'une carence en fer, d'un problème d'hyper-hémolyse ou à une insuffisance de synthèse de l'hémoglobine et certaines caractéristiques comme la microcytose, la splénomégalie, la thrombocytose et le nombre élevé de globules rouges peuvent s'expliquer comme des conséquences de l'anémie. Le principal constituant des globules rouges est l'hémoglobine. Si la synthèse de cette protéine est perturbée ou s'il y a une perte, le cytoplasme est moins dense et les cellules présentent une microcytose suite à la poursuite dans la moelle osseuse des mitoses des érythroblastes insuffisamment hémoglobinisés. La rate est un organe du système réticulo-endothélial qui participe à l'hémolyse des globules rouges trop vieux dans le système réticulo-endothélial, à l'hématopoïèse, le stockage des plaquettes et les défenses immunitaires. La splénomégalie peut s'expliquer par un mauvais fonctionnement de la rate qui « consomme » trop de globules rouges ou simplement au fait que la rate détruit des globules rouges malades. La thrombocytose ou la présence dans le sang d'un nombre élevé de plaquettes est souvent un signe d'une réaction inflammatoire, d'une hyper-hémolyse ou d'une hémorragie majeure. Enfin suite à une anémie, la moelle osseuse peut répondre par une hyper production de globules rouges et le nombre élevé de globules rouges ainsi que l'hématopoïèse extra-médullaire suggèrent une anémie régénérative.

L'anémie se traduisant par une diminution de la pigmentation normale des globules rouges peut être la conséquence de deux phénomènes ; une carence en fer l'élément indispensable à la synthèse de l'hémoglobine ou une diminution anormale de la teneur en hémoglobine suite à une fragilité des globules rouges. Nous avons donc exploré ces deux hypothèses pour essayer de comprendre le rôle de la protéine TSAP6 dans le développement de cette anémie.

1^{ère} hypothèse : anémie hémolytique

Certains résultats prouvent qu'il ne s'agit pas d'insuffisances médullaires. En effet, la splénomégalie, la forte hématopoïèse extra-médullaire et le taux élevé de globules rouges montrent qu'il y a une érythropoïèse et que l'animal répond à l'anémie. D'autres résultats nous montrent bien qu'il ne s'agit pas d'une carence en fer puisque le taux de fer, de ferritine ou de TF ne varient pas. Par contre plusieurs résultats font penser que, dans notre cas, il s'agirait d'une anémie hémolytique. L'aniso/pïokilocytose des globules rouges montrent que ces cellules ont un problème au niveau de la membrane. On peut noter également que, chez certaines souris, le taux de bilirubine est plus élevé. De plus la protéine TSAP6 étant une protéine membranaire, sa délétion pourrait très bien induire une fragilité de la membrane. Pour démontrer cette hypothèse, nous avons testé la fragilité osmotique des globules rouges en milieu hyper-osmotique en présence de sucrose. Cette expérience montre bien que les globules rouges issus de souris knockout pour le gène *tsap6* sont plus fragiles et ce résultat

argumente le fait que l'anémie pourrait être due à une importante hémolyse des globules rouges (**Fig. 49F**). Des expériences préliminaires montrent également que la protéine TSAP6 est localisée à la membrane des réticulocytes et confortent l'idée que la perte de la protéine TSAP6 pourrait être en partie responsable de la fragilité osmotique et de l'anémie.

2^{ème} hypothèse : anémie ferriprive

Puisque cela ne peut pas être un problème de nutrition et qu'il ne semble pas y avoir de carence en fer, il pourrait s'agir d'un problème d'absorption du fer par la cellule. Comme il l'a été démontré plusieurs fois le cycle de la TF est très important pour l'apport de fer dans la cellule et une déficience à ce niveau pourrait très bien induire une anémie microcytaire hypochromique (Craven et al., 1987) (Lim et al., 2005) (Zhang et al., 2006). Nous avons donc cherché de ce côté là pour savoir si le problème pouvait venir de là.

Le métabolisme du fer se fait en cercle clos (Dunn et al., 2007) (Donovan et al., 2006) (Andrews et al., 1999). Les entrées et les sorties sont très faibles par rapport au stock. Seulement 1 à 2 mg de fer entre et sort par jour alors qu'un adulte normalement constitué contient 35 à 45 mg de fer par kg (**Fig. 50**). Une fois passé à travers l'épithélium du duodénum grâce aux protéines DCYTB et aux transporteurs DMT1 (**Divalent Metal Transporter 1**), le fer est libéré dans le sang sous sa forme Fe³⁺ où il va se fixer sur la Transferrine (TF) (Gunshin et al., 2005) (Fleming et al., 1997). Le complexe TF-Fe³⁺ va ensuite se lier avec une forte affinité aux récepteurs TF-R présents à la surface des érythroblastes et de toutes les cellules de l'organisme. Par endocytose, le récepteur TF-R va faire entrer dans les érythroblastes le Fer lié à la TF. La majorité du fer pénétrant dans les érythroblastes est utilisée par la mitochondrie pour la synthèse de l'hème, le composant principal de l'hémoglobine. Chez la souris, il est suggéré que le Fe²⁺ est transporté dans la mitochondrie via le récepteur Mitoferrin (Shaw et al., 2006).

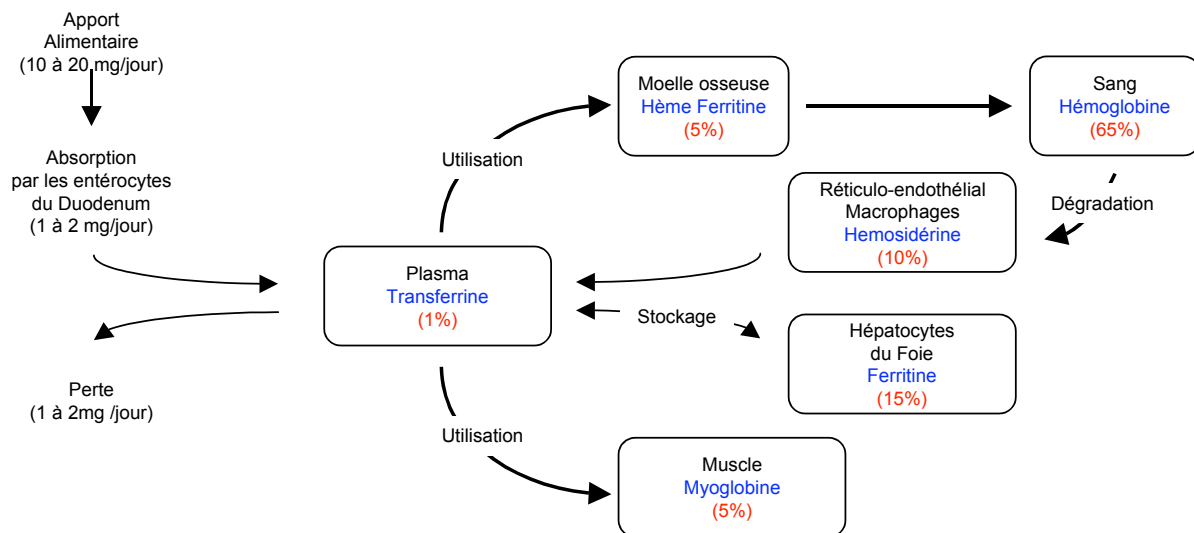


Figure 50 : Distribution du fer dans l'organisme.

Environ 70% du fer est contenu dans l'hémoglobine et participe au développement des érythroblastes et des cellules rouges matures.

Vu que la plus grande partie du fer est stockée dans l'hémoglobine, que nous avons un phénotype essentiellement sanguin et que par immunofluorescence, on montre une colocalisation de TSAP6 avec le récepteur TF-R, nous nous sommes intéressés naturellement à la maturation des érythrocytes au cours de l'érythropoïèse pour voir si le phénotype était dû à un problème en amont. Pour cela nous avons d'abord regardé l'état de l'expression du TF-R à la surface des cellules sanguines sur des animaux non traités à la phenylhydrazine (**Fig. 51**). On observe par Cytométrie de flux que dans les animaux KO, l'expression du TF-R à la surface des cellules fraîchement isolées est plus élevée. Le taux élevé du Thiazole Orange un marqueur à ARN montre également qu'il y a un problème de maturation chez ces animaux déficients en TSAP6. Lorsqu'on fait le ratio=(% TF-R)/(% Thiazole Orange), on constate que chez les animaux KO, 61% des cellules immatures sont positives pour le TF-R alors que dans les animaux WT, seulement 39% des cellules immatures sont positives au TF-R. Ce rapport souligne l'association entre le déficit de maturation et le problème d'expulsion du TF-R dans ces cellules sanguines. Ensuite nous avons contrôlé l'expression du TF-R par Cytométrie de flux et par Western-Blot au cours d'un test de maturation de réticulocytes en érythrocytes *in vitro* à partir d'animaux traités à la phenylhydrazine pour augmenter la proportion de réticulocytes (**Fig. 51B et 52A**).

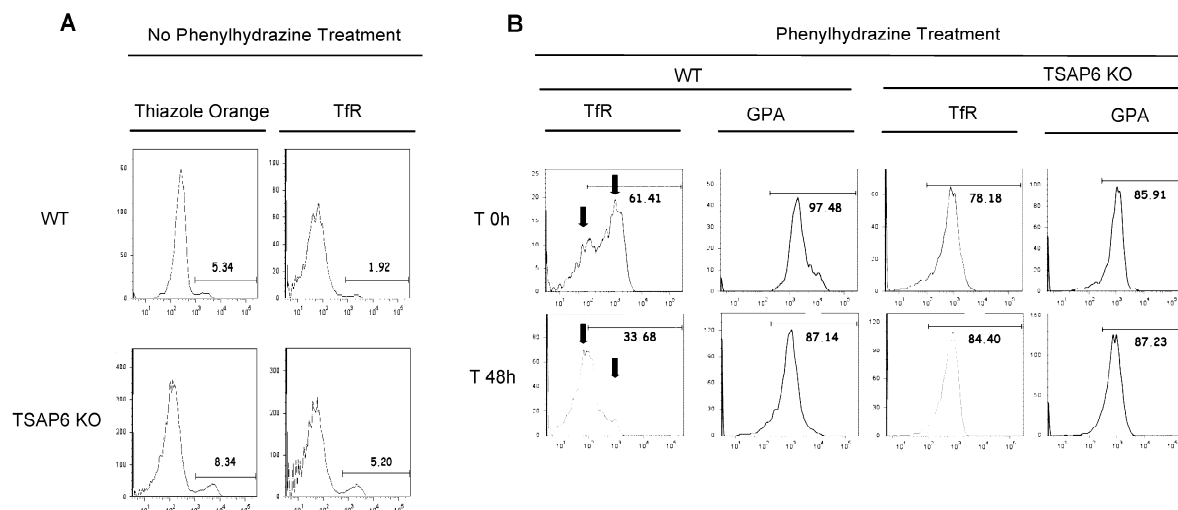


Figure 51 : Expression de TF-R au cours de la maturation des réticulocytes.

A : analyse par Cytométrie de flux de la présence de TF-R à la surface des cellules sanguines. Le Thiazole Orange marque l'ARN et est un contrôle de la différenciation des cellules sanguines. **B** : analyse par Cytométrie de flux de la présence de TF-R et GPA à la surface de réticulocytes fraîchement isolés d'animaux traités à la phenylhydrazine ou après une maturation *in vitro* de 48Hrs. Les flèches indiquent le changement d'expression de TF-R au cours de la maturation.

Au cours de la maturation des érythrocytes, il y a réduction de la taille des cellules, expulsion du noyau et autres organites comme le Golgi, le RE, les lysosomes et une partie de sa membrane plasmique, perte d'ARN et augmentation de la synthèse d'Hémoglobine. Au cours de cette érythropoïèse, la cellule se débarrasse de 50% de ces protéines et au bout de 8 jours elle obtient sa forme caractéristique de cellule anucléée (Waugh et al., 1997). Le TF-R fait partie de ces protéines éliminées au cours de la maturation en érythroblastes. Alors qu'un proérythroblaste contient du TF-R en abondance, l'érythrocyte une fois mature n'en contient plus.

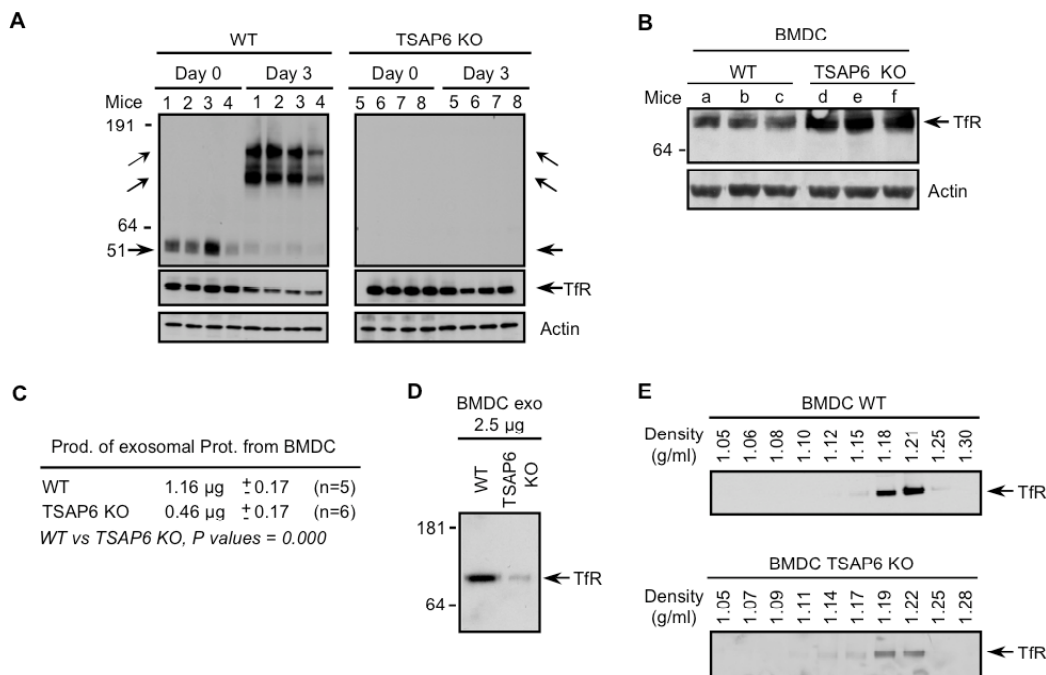


Figure 52 : Expression et s cretion de TF-R.

A et B : analyse par Western-Blot de TF-R au cours de la maturation des réticulocytes (**A**) ou dans les BMDC (**B**). **C :** analyse quantitative des protéines d'exosomes sécrétées par les BMDC. **D :** analyse par Western-Blot du TF-R dans les exosomes sécrétés par les BMDC. **E :** analyse par Western-Blot du TF-R sur un gradient linéaire de sucrose obtenu à partir de 30 μg de protéines d'exosomes sécrétés par les BMDC.

On observe que dans les animaux WT, 61,4% des cellules sont positives au TF-R   J=0 et seulement 33,7% à J=2 alors que dans les animaux KO, 78,2% des cellules sont positives au TF-R   J=0 et 84,4% à J=2. Ces résultats sont confirmés par Western-Blot. On note également qu'au cours de la maturation des réticulocytes, alors que le TF-R est expulsé de la cellule, la protéine TSAP6 n'est pas expulsée et à tendance à se dimériser et s'oligomériser. Il semblerait que les réticulocytes de souris KO pour le gène *tsap6* n'éliminent pas le TF-R. Nous savons que la cellule, suite à une déficience en fer maintient un fort taux de traduction du TF-R. Le nombre de TF-R d'une cellule est directement proportionnel aux besoins en fer de cette cellule. Quand par exemple la cellule a besoin de fer, les protéines IRP (Iron Regulatory Protein) viennent se fixer sur les régions régulatrices de l'ARNm du gène *tf-r* afin de le préserver d'une dégradation et d'augmenter le nombre de TF-R   la surface de la cellule. Le TF-R contient 5 sites en 3' de son ARNm pour les IRP.   l'inverse, l'APO-FERRITINE contient 1 site pour IRP dans sa région 5' de son ARNm, lors d'une carence en fer, le maintien de IRP en 5' de ce gène bloque sa traduction. Les autres gènes nécessaires au transport et au stockage du fer comme le transporteur DMT1, la TF et la ferritine sont également régulés par la concentration en fer et leurs ARNms contiennent dans leur partie r glatrice des sites pour les IRP (Hentze et al., 2004). Cette régulation pourrait expliquer pourquoi à J=0 les cellules contiennent plus de TF-R mais ensuite pourquoi les réticulocytes issus des souris KO, ne perdent pas le TF-R lors de la maturation. Il ne s'agit pas de néo-synthèse, la cellule a perdu les organites nécessaires à la synthèse protéique. Alors comment expliquer ce fort taux de TF-R ?

La quasi-totalité du matériel perdu par les réticulocytes pendant leur maturation se fait par les exosomes, nous nous sommes donc intéressés à la production des exosomes durant la maturation de ces cellules. Un défaut dans la formation des exosomes pourrait expliquer le fait que les cellules KO ne perdent pas de TF-R au cours de leur maturation. Les réticulocytes étant très fragiles, il était très difficile de réaliser la sécrétion des exosomes sur ces cellules. Nous avons donc vérifié notre hypothèse sur un autre type cellulaire : les BMDC (**B**one **M**arrow **D**endritic **C**ell). Nous constatons tout d'abord le même phénomène que pour les réticulocytes, les BMDC de souris KO contiennent plus de TF-R total (**Fig. 52**). De plus, elles sécrètent deux fois moins d'exosomes. Une analyse protéique de ces exosomes montre qu'ils contiennent beaucoup moins de TF-R. La délétion du gène *tsap6* dans ces souris est à l'origine d'un problème de maturation des réticulocytes et un défaut dans l'élimination des récepteurs TF-R via l'expulsion des exosomes.

Perturbation de la voie de régulation de l'apoptose

Comme notre équipe la montrée dans un précédent article, la protéine TSAP6 est une protéine pro-apoptotique directement transcrite par la protéine P53, qui induit lorsqu'elle est activée l'arrêt du cycle cellulaire en G2 et la mort des cellules par apoptose (Passer et al., 2003). Nous avons voulu vérifier ces données sur ces souris KO. Ici pour stimuler TSAP6 dans des cellules ou des animaux, nous utilisons les γ -irradiations. Après une exposition suffisamment forte, les cellules vont subir des cassures au niveau de l'ADN provoquant l'activation de la protéine P53 et la mort des cellules par apoptose.

Suite à une γ -irradiation, les MEFs WT montrent par Western-Blot une activation des protéines TSAP6 et P21 et par Cytométrie de flux un blocage des cellules en G2. Par contre les MEFs déficientes en TSAP6 ne sont pas bloquées en G2 (**Fig. 53**). Une seconde expérience de γ -irradiation, cette fois sur des animaux et une analyse de la rate par TUNEL (TdT-mediated X-dUTP Nick End Labeling) sur coupe montre qu'un plus grand nombre de cellules dans les animaux WT ont subi des dommages à l'ADN. Il y a plus de cellules positives marquées au TUNEL en comparaison à la rate issue d'animaux KO. Cette réponse s'accompagne d'une augmentation de la protéine P21 autant chez les animaux WT que les KO, mais la protéine PARP est beaucoup moins clivée dans les animaux KO (**Fig. 53**)

Les souris déficientes pour le gène TSAP6 montrent aussi un défaut dans la capacité à bloquer les cellules en G2 lors de l'activation de la protéine P53. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus dans des modèles cellulaires dans lesquels l'activation de la protéine TSAP6 par un signal apoptotique bloquée la protéine MYT1 sous une forme non-phosphorylée qui agissait en bloquant l'activité de la protéine CDC2 et en bloquant la transition G2->M.

Les souris déficientes pour le gène TSAP6 montrent également un défaut dans la capacité à transmettre le signal apoptotique, les expériences de TUNEL montrent bien que pour un même signal il y a beaucoup de cellules apoptotiques dans les souris KO. Ceci peut également s'expliquer par les premiers résultats qui montraient que l'activation de la protéine TSAP6 pouvait induire l'expression de NIX, une protéine pro-apoptotique qui se transloque à la mitochondrie et inhibe les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL.

Les souris KO pour le gène TSAP6 montrent une déficience de la voie de l'apoptose. Normalement l'induction de cassures au niveau de l'ADN par des γ -irradiations provoque d'abord un arrêt du cycle des cellules en G2 puis une mort de ces cellules si les dommages sont trop importants. Ici ces animaux en sont déficients. Ces résultats confirment bien le rôle

de TSAP6 dans la signalisation de l'apoptose dans la cellule suite à des dommages à l'ADN et l'activation de la protéine P53.

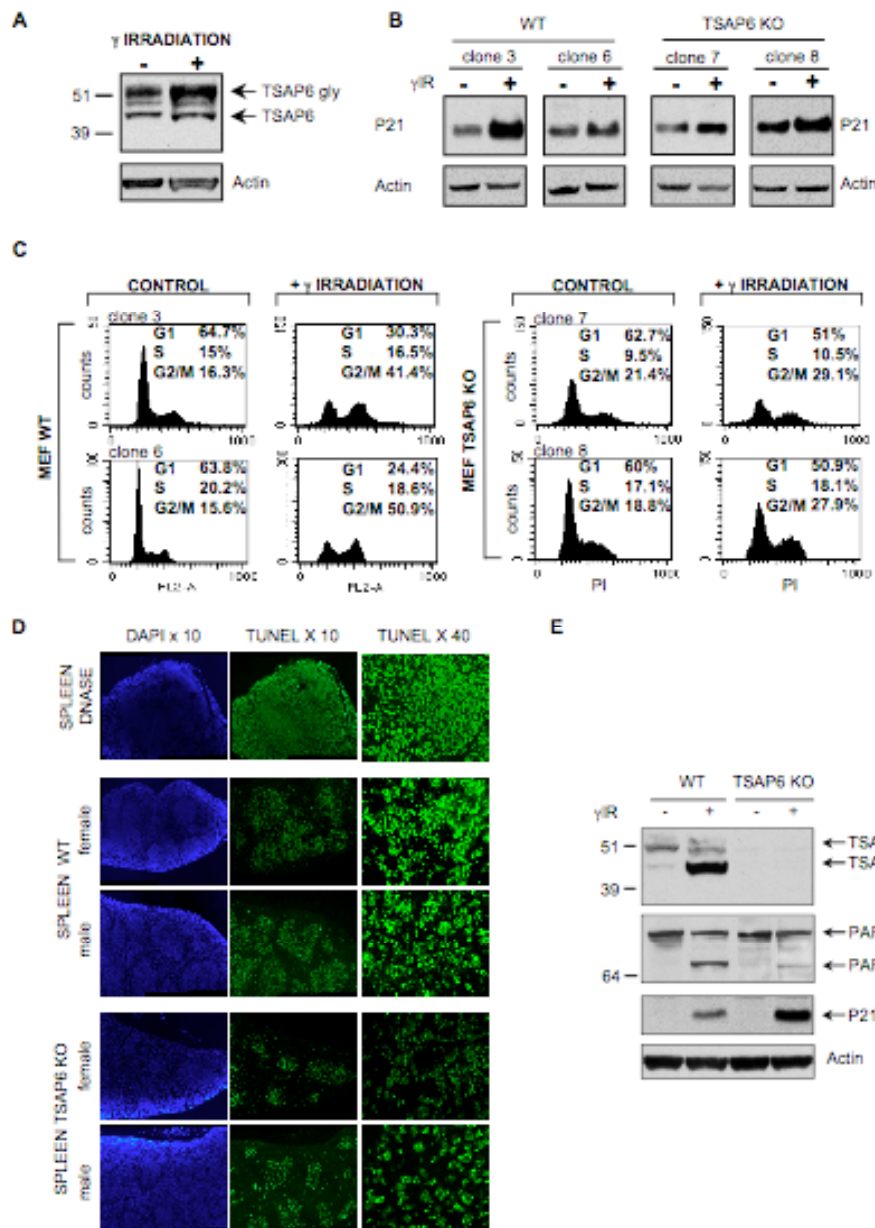


Figure 53 : La délétion de TSAP6 crée une déficience dans le processus de l'apoptose.

A et B : analyse par Western-Blot de l'activation de TSAP6 et P21 dans les MEFs après 24Hrs à 10Gy de γ -irradiations, l'Actine sert ici de contrôle de dépôt. **C :** analyse du cycle cellulaire par Cytométrie de flux des MEFs WT et KO 24Hrs après les γ -irradiations. **D :** analyse des cellules positives pour le TUNEL (cellules vertes) après une γ -irradiation de 15Gy. **E :** analyse par Western-Blot du clivage de la PARP et de l'activation de P21 et TSAP6 dans la rate des animaux irradiés.

Défaut dans la production des exosomes

Notre équipe a montré en 2004 ; que la surexpression de la protéine TSAP6 augmente la sécrétion de la protéine TCTP via les exosomes (Amzallag et al., 2004). Le groupe de Levine

a montré à son tour en 2006, que la surexpression de la protéine TSAP6 pouvait augmenter la sécrétion d'exosomes (Yu et al., 2006). On vient de présenter que lors de leur différenciation, les BMDC de souris KO sécrètent deux fois moins d'exosomes comparé aux BMDC de souris WT et que dans les cellules de ces souris KO, il y a un problème dans la transmission du signal apoptotique suite à une γ -irradiation. Nous avons donc regardé la sécrétion d'exosomes suite à l'activation de la protéine P53 par dommage à l'ADN dans deux types cellulaires (**Fig. 54**).

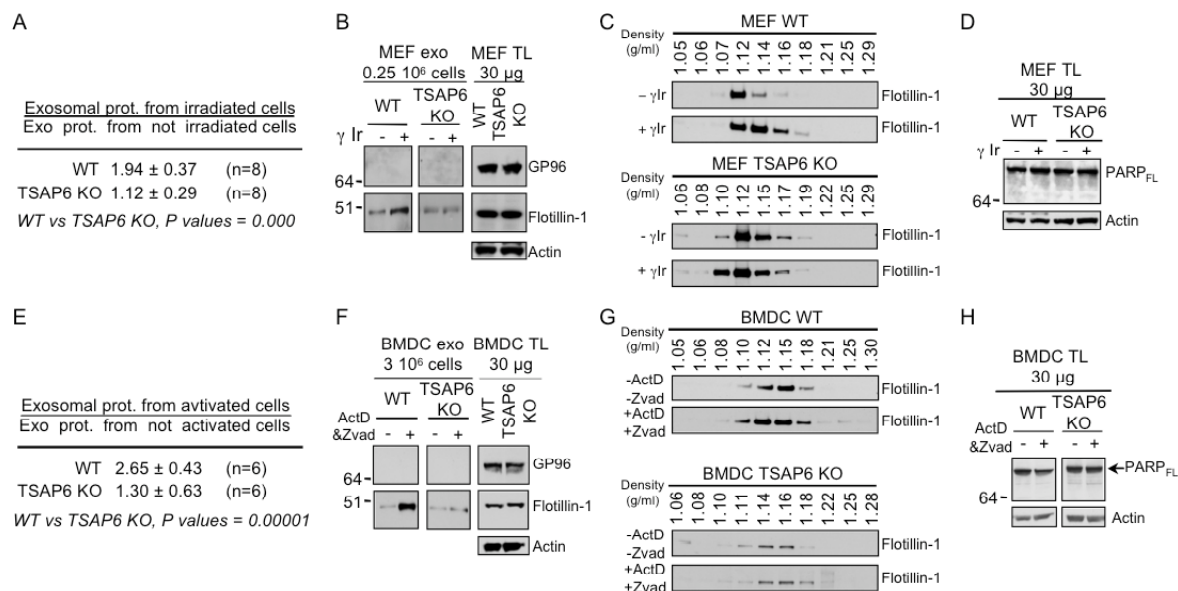


Figure 54 : Analyse de la production d'exosomes après γ -irradiation ou Actinomycine D.

(A à D : MEFs après irradiations) (E à H : BMDC après traitement à l'ActD) A et E : analyse quantitative de la production de protéines d'exosomes dans des MEFs et des BMDC. B et F : analyse par Western-Blot des protéines d'exosomes. C et G : analyse par Western-Blot des gradients linéaires de sucrose réalisés à partir des exosomes sécrétés par les MEFs et les BMDC. D et H : analyse par Western-Blot du clivage de la PARP.

Les MEFs et les BMDC sécrètent naturellement des exosomes. Si on stimule P53 par γ -irradiation ou par l'ActD, on induit la sécrétion d'exosomes dans les cellules WT. Ces résultats montrent que les cellules déficientes en TSAP6 ne répondent pas à la stimulation de P53 et sécrètent moins d'exosomes.

Discussion

Nous avons montré précédemment que la protéine TSAP6 est une protéine directement régulée par P53, que son activation induit le blocage du cycle cellulaire en G2 et la mort cellulaire par apoptose. Nous avons également montré que TSAP6 pouvait réguler la sécrétion de TCTP, publiant pour la première fois un mécanisme expliquant la sécrétion de la protéine TCTP.

Dans cet article, nous montrons tout d'abord que la protéine TSAP6 existe sous deux formes dans les cellules murines, une forme non-glycosylée et une forme glycosylée. Ceci est tout à fait cohérent avec la localisation de TSAP6 au Golgi et plus particulièrement au niveau du TGN sachant que les protéines qui transitent par le Golgi peuvent faire l'objet de glycosylation avant leur sécrétion (exocytose) ou leur adressage vers les lysosomes. De plus, la localisation de TSAP6 au niveau du TGN et avec des vésicules d'endosomes nous conforte

également dans l'idée que cette protéine peut avoir un lien dans la régulation de la sécrétion. Le TGN est un organite central pour la sécrétion des protéines par la voie classique RE/Golgi et la voie de sécrétion non classique des exosomes. Le RE délivre les protéines par fusion de vésicules avec la membrane du réseau cis-Golgien, les protéines sont ensuite transportées du réseau cis-Golgien vers le Golgi médian pour finalement atteindre le TGN (Mellman et al., 1992). Au niveau du TGN, les nouvelles protéines sont triées et placées dans des vésicules de transport pour être distribuées au niveau de leur destination cellulaire spécifique (Keller et al., 1997). Il existe également un lien entre les exosomes et le TGN, la biogenèse des exosomes pourrait se faire par un apport de protéines néosynthétisées par le TGN aux endosomes précoces.

Nous montrons ensuite que les souris déficientes pour le gène *TSAP6* présentent une anémie microcytaire accompagnée d'une splénomégalie et d'une érythrocytose. En juin 2005, le groupe de Fleming publie des premiers résultats de phénotype sur des souris *nm1054* ayant une partie du Chr. 1 manquant. Ces souris *nm1054* montrent une anémie microcytaire hypochromique accompagné d'une érythrocytose et d'une légère anisopoikilocytose. Certains organes comme la rate et le cœur ont également une taille plus importante par rapport à la taille du corps. Dans ces souris, les plaquettes et les cellules blanches sont aussi augmentées (Ohgami et al., 2005). En novembre de la même année, la même équipe publie un article dans lequel ils ont identifié le gène responsable de ce phénotype, il s'agit du gène *tsap6* (Ohgami et al., 2006). Dans ces deux articles, les auteurs ont essayé de comprendre la cause de l'anémie et ils ont conclu que la protéine *TSAP6* pouvait être une ferric-réductase réduisant le Fe^{3+} en Fe^{2+} à l'intérieur de l'endosome avant sa sortie par le transporteur DMT1 et son utilisation par la mitochondrie. Ils montrent que la délétion du gène *tsap6* crée un défaut dans le transfert endosomale du fer à l'intérieur de la cellule et que plus particulièrement la délétion du gène *tsap6* bloquerait la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} ce qui inhiberait la synthèse de l'hémoglobine et générerait l'anémie.

Nos résultats suggèrent que cette anémie pourrait plutôt être associée à une mauvaise maturation des réticulocytes. Des études par cytométrie de flux et par Western-Blot montrent que le TF-R est maintenu à un taux très élevé dans les animaux KO. Cette forte expression de TF-R dans les globules rouges est due à un défaut dans la biogenèse des exosomes servant à expulser le TF-R au cours de la maturation des réticulocytes. Il s'agit en fait d'une anémie ferriprive par mauvaise absorption du fer. En effet, l'endocytose du TF-R est indispensable pour faire rentrer le fer dans les globules rouges.

Comme on l'a montré précédemment, l'activation de la protéine P53, induit l'expression de la protéine *TSAP6* qui va à son tour bloquer les cellules en G2 et induire la mort de la cellule par apoptose. Ici les animaux KO pour *TSAP6* ne semblent pas répondre de la même manière à l'activation de P53. En effet, les cellules ne sont pas bloquées en G2 et l'on compte moins de cellules apoptotiques après γ -irradiations des animaux.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la stimulation de la sécrétion d'exosomes suite à l'activation de la protéine P53. Chez les animaux WT, l'activation de P53 par des lésions sur l'ADN induit la sécrétion d'exosomes alors que les animaux KO pour *TSAP6* ne semblent pas répondre à cette stimulation.

Ces résultats confirment que *TSAP6* est un élément majeur dans la signalisation de l'apoptose suite à l'activation de P53 par lésion de l'ADN et qu'il est un élément clef dans la régulation de la sécrétion des exosomes.

ARTICLE 2.**TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.**

(Susini L.*, Besse S.*, Duflaut D.*, Lespagnol A.*, Beekman C.* et al. 2008)

* : les auteurs ont contribué de manière équivalente à ces travaux.

Afin de compléter l'étude fonctionnelle de la protéine anti-apoptotique TCTP, en 2002 notre équipe a entrepris de générer des souris KO pour ce gène et d'étudier l'effet de cette délétion chez l'animal. Nous avons également entrepris une étude structurale de TCTP en cristallisant la protéine d'origine humaine.

La délétion du gène *tpt1* est létale pour l'animal. La perte de *tctp* induit un ralentissement de la croissance cellulaire et une augmentation de l'apoptose au cours de l'embryogenèse conduisant à la mort de l'embryon entre le 6,5 et 9,5ème jour du développement.

La résolution de la structure de la protéine humaine de TCTP par cristallographie avec une résolution de 2Å a révélé une homologie de structure entre les hélices H2 et H3 de TCTP et les hélices H5 et H6 de BAX une protéine pro-apoptotique impliquée dans la perméabilité de la membrane mitochondriale. La surexpression de TCTP inhibe l'effet apoptotique de la staurosporine et de la protéine BAX dans des cellules 293T et N2A et des mutations au niveau des hélices H2 et H3 de TCTP annulent cet effet de protection.

Nous montrons que TCTP se fixe sur les mitochondries et inhibe l'effet pro-apoptotique de BAX en inhibant sa dimérisation au niveau de la membrane mitochondriale mais pas la fixation de BAX sous une forme monomère. On a également noté que les mutations sur les hélices H2 et H3 n'inhibent pas la dimérisation de BAX mais n'empêchent pas non plus la liaison aux mitochondries de TCTP laissant supposer que les hélices intactes sont nécessaires à la fonction anti-apoptotique de TCTP mais pas à sa fixation à moins que cette liaison aux mitochondries ne se fasse pas par l'intermédiaire des deux hélices.

Cet article confirme le rôle anti-apoptotique de la protéine TCTP et donne aussi quelques indices sur son mécanisme d'action pour effectuer cette fonction.

TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.

Laurent Susini^{1,6}, Stephanie Besse^{1,6}, Dominique Duflaut^{1,6}, Alexandra Lespagnol^{1,6}, Chantal Beekman^{2,6}, Guisy Fiucci¹, Andrew R. Atkinson³, Didier Busso³, Pierre Poussin³, Jean-Christophe Marine², Jean-Claude Martinou⁴, Jean Cavarelli³, Dino Moras³, Robert Amson^{1,5} and Adam Telerman^{*,1,5}

Cell Death and Differentiation Nature Publishing Group
Advance online publication, 15 February 2008

*1 Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier, Paris, France; 2 Laboratory for Molecular Cancer Biology, VIB-UGent, Technologiepark, Ghent, Belgium; 3 Departement de Biologie et Genomique Structurales, UMR 7104, Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France and 4 Department of Cell Biology, University of Geneva, Quai Ernest-Ansermet 30, Geneva, Switzerland *Corresponding author: A Telerman, LBPA UMR 8113, Ecole Normale Supérieure, 61 Avenue du President Wilson, 94235 Cachan, France. Tel: ?33-6 20 89 13 82; Fax: ?33-1 47 40 76 71; E-mail: adam.telerman@lbpa.ens-cachan.fr and telerman@noos.fr 5 Present address: Laboratoire de Biotechnologie et Pharmacologie genetique Appliquee (LBPA) UMR 8113, Ecole Normale Supérieure, 61 Avenue du President Wilson, 94235 Cachan, France.
6 These authors contributed equally to this paper.*

TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function

L Susini^{1,6}, S Besse^{1,6}, D Duflaut^{1,6}, A Lespagnol^{1,6}, C Beekman^{2,6}, G Fiucci¹, AR Atkinson³, D Busso³, P Poussin³, J-C Marine², J-C Martinou⁴, J Cavarelli³, D Moras³, R Amson^{1,5} and A Telerman^{*,1,5}

Translationally controlled tumor protein (TCTP) is a potential target for cancer therapy. It functions as a growth regulating protein implicated in the TSC1–TSC2–mTOR pathway or a guanine nucleotide dissociation inhibitor for the elongation factors EF1A and EF1B β . Accumulating evidence indicates that TCTP also functions as an antiapoptotic protein, through a hitherto unknown mechanism. In keeping with this, we show here that loss of *tctp* expression in mice leads to increased spontaneous apoptosis during embryogenesis and causes lethality between E6.5 and E9.5. To gain further mechanistic insights into this apoptotic function, we solved and refined the crystal structure of human TCTP at 2.0 Å resolution. We found a structural similarity between the H2–H3 helices of TCTP and the H5–H6 helices of Bax, which have been previously implicated in regulating the mitochondrial membrane permeability during apoptosis. By site-directed mutagenesis we establish the relevance of the H2–H3 helices in TCTP's antiapoptotic function. Finally, we show that TCTP antagonizes apoptosis by inserting into the mitochondrial membrane and inhibiting Bax dimerization. Together, these data therefore further confirm the antiapoptotic role of TCTP *in vivo* and provide new mechanistic insights into this key function of TCTP.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 15 February 2008; doi:10.1038/cdd.2008.18

Inhibition of apoptosis plays a key role in permitting and favoring cell proliferation in malignant tissues.¹ The characterization of proteins that promote or inhibit apoptosis, and the identification of their mechanism of action, constitute an important step towards the understanding of programmed cell death as a biological process and its implication in diseases. Recently, translationally controlled tumor protein (TCTP) has been suggested to function as an antiapoptotic protein in cultured cells.^{2–7} Overexpression of TCTP resulted in an inhibition of etoposide-induced apoptosis,³ whereas antisense and siRNA knockdown experiments resulted in increased apoptosis.^{5,7} It was more recently shown that TCTP binds to MCL1^{2,4,7} and Bcl-xL,⁶ both antiapoptotic members of the Bcl2 family. However, the physiological relevance of these data *in vivo* and the molecular mechanisms through which TCTP protects cells from apoptosis remain to be established. TCTP shares no sequence homology with known antiapoptotic molecules nor it exhibits structural features that could account for such an antiapoptotic function.

TCTP is highly conserved in all eukaryotes and encodes for a hydrophilic protein of 18–23 kDa^{8,9} that shows no sequence similarity with any other known proteins. TCTP

was discovered over 20 years ago in Ehrlich ascites tumor cells.¹⁰ Its name originates from the observation that TCTP transcripts accumulate in resting cells and are rapidly translated into the protein when the cells require it. The TCTP protein is expressed at low levels in resting cells, and at elevated levels in proliferating ones. TCTP expression in proliferating yeast (*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)) rises for instance to 100 000 copies per cell, which is higher than actin with 60 000 copies per cell.¹¹ These data, in addition to very recent genetic studies, suggest that beside its antiapoptotic function TCTP may be required for cell growth and proliferation. For instance, *Drosophila* TCTP was shown to control cell growth and proliferation through regulation of Rheb-GTPase activity.¹² In addition to its role in the control of cell survival and proliferation, TCTP was also reported to bind tubulin,¹³ to serve as a substrate of Polo-like kinase 1 (Plk1)¹⁴ and to act as a histamine releasing factor.¹⁵

TCTP is overexpressed in most tumor cells and its down-regulation decreases the viability of those cells.⁵ Understanding the molecular mechanisms through which TCTP acts as a pro-survival factor in normal and cancer cells is therefore not only an interesting biological issue but it is also relevant for cancer therapy.¹⁶ In the present work, we show that TCTP

¹Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier, Paris, France; ²Laboratory for Molecular Cancer Biology, VIB-UGent, Technologiepark, Ghent, Belgium; ³Département de Biologie et Génétique Structurales, UMR 7104, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France and ⁴Department of Cell Biology, University of Geneva, Quai Ernest-Ansermet 30, Geneva, Switzerland

*Corresponding author: A Telerman, LBPA UMR 8113, École Normale Supérieure, 61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France. Tel: + 33-6 20 89 13 82; Fax: + 33-1 47 40 76 71; E-mail: adam.telerman@lbpa.ens-cachan.fr and telerman@noos.fr

⁵Present address: Laboratoire de Biotechnologie et Pharmacologie génétique Appliquée (LBPA) UMR 8113, École Normale Supérieure, 61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France.

⁶These authors contributed equally to this paper.

Keywords: TCTP; mitochondria; TCTP knockout mice

Abbreviations: TCTP, translationally controlled tumor protein; MEFs, mouse embryo fibroblasts; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling; IVT, *in vitro* translation; TSC, tuberous sclerosis complex

Received 24.10.07; revised 10.1.08; accepted 14.1.08; Edited by KH Vousden

functions as an antiapoptotic protein required for mouse embryonic development. Moreover, we solved the crystal structure of TCTP and found an interesting structural similarity to channel-forming helices¹⁷ of the pro-apoptotic protein Bax.¹⁸ This led us to explore one of the potential mechanism by which TCTP exerts its antiapoptotic function and to propose that this is occurring by insertion of TCTP into the mitochondrial membrane and inhibiting the dimerization of Bax.

Results

tctp is required for cell survival and mouse embryonic development. The murine *tctp* gene is located on chromosome 14 and contains 6 exons.¹⁹ To generate a *tctp* mutant mouse line, a loxP site was inserted 5' of exon 3 and two loxP sites flanking a neomycin resistance gene were inserted 3' of exon 5 by homologous recombination in

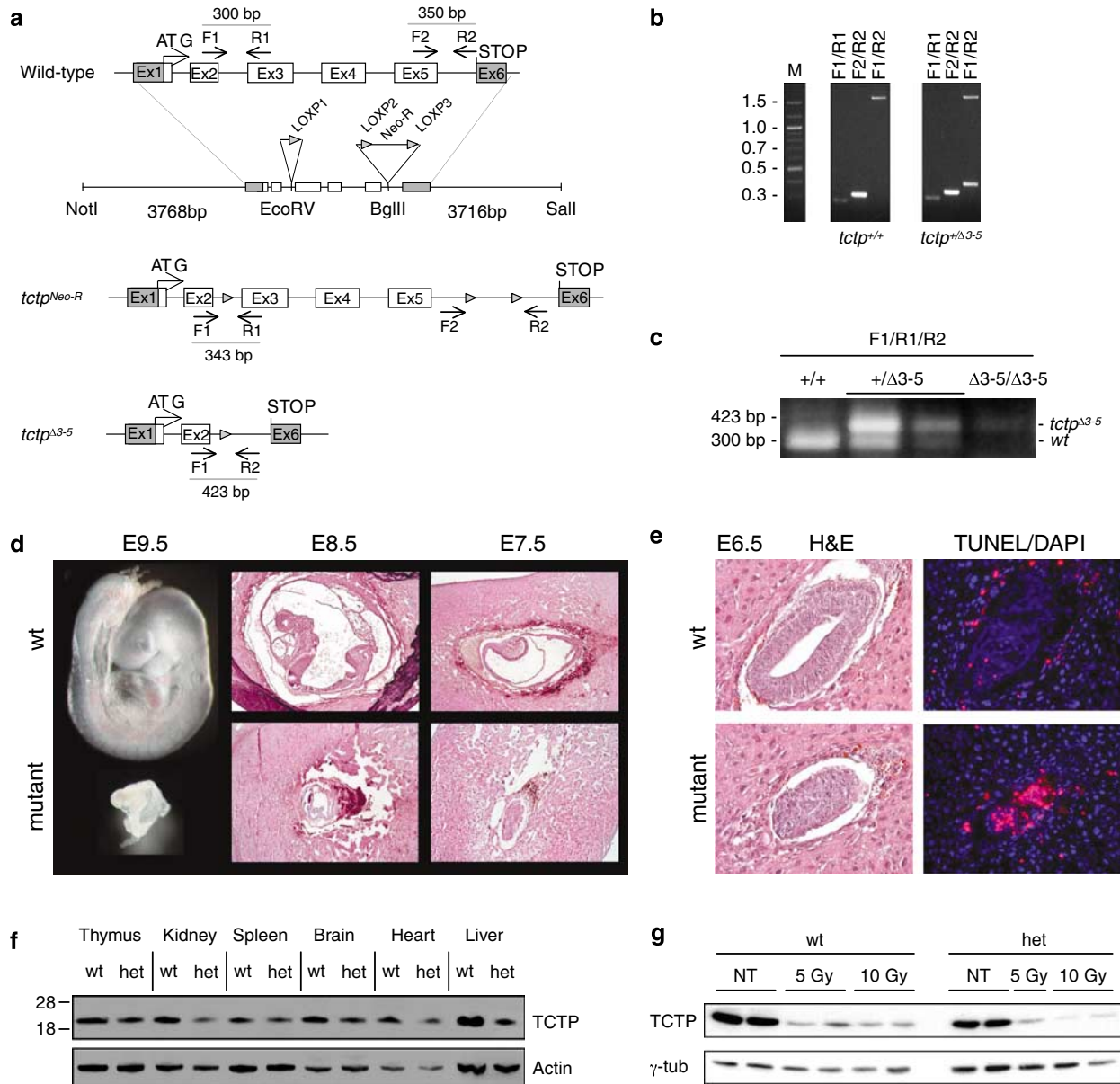


Figure 1 (a) Representation of the mouse wild-type and mutated *tctp* alleles and the targeting vector used to generate these alleles. F1, R1, F2, and R2 indicate the positions of the primers used to discriminate between the various *tctp* alleles (see b and c). (b) PCR analysis on genomic DNA from wild-type (WT) and *tctp* heterozygous (*+ / Δ3-5*) mice. The various primers used for the different PCRs are indicated (see Materials and Methods for their sequences) (c) PCR analysis on genomic DNA from wild-type (*+/+*) and *tctp* heterozygous (*+ / Δ3-5*) and homozygous mutant (*Δ3-5 / Δ3-5*) embryos. (d) *tctp*-wild-type and -mutant embryos at different stages of development. Hematoxylin-eosin staining of sections of paraffin-embedded E8.5 and E7.5 embryos are shown. Magnification: $\times 4$. (e) Hematoxylin-eosin (H&E) staining of sections of paraffin-embedded E6.5 embryos is shown. Detection of apoptotic cells (red) was performed using TUNEL assay on sections of paraffin-embedded E6.5 embryos; the sections were counterstained using DAPI (blue). Magnification: $\times 20$. (f) Western blot analysis of TCTP protein expression in different organs (30 μ g protein loaded) from wild-type (wt) and *tctp* heterozygous (het) mice; anti-Actin is used as loading control. (g) TCTP protein levels as determined by western blotting in freshly isolated thymocytes from wild-type (wt) and *tctp* heterozygous (het) mice. The cells were either left untreated (NT) or were γ -irradiated with 5 Gy or 10 Gy. Lysates were prepared 12 h after irradiation. Anti- γ -tubulin (γ -tub) is used here as loading control

embryonic stem (ES) cells (Figure 1a). Correctly targeted ES clones (*tctp*^{Neo-R/+}) were obtained, as assessed by PCR and Southern blot, and Cre-mediated excision of exons 3–5, which encodes for most of the *tctp* protein, was achieved upon electroporation of a Cre-recombinase expression vector in those cells. One clone that showed proper deletion of exons 3–5 (*tctp*^{Δ3–5/+}), as identified by PCR analysis, was used to establish a *tctp* mutant mouse line. Mice were genotyped using a PCR-based approach using primers F1, R1, F2, and R2 (Figure 1b and c).

Heterozygous mice for this mutation (*tctp*^{Δ3–5/+}) are viable and fertile. However, matings between heterozygous animals produced no viable homozygous mutant offspring (F2), indicating a recessive lethal phenotype (Supplementary Table 1).

Closer inspection revealed that most homozygous embryos (*tctp*^{Δ3–5/Δ3–5}) died *in utero* between 6.5 and 9.5 d.p.c. The majority of the E6.5 and 100% of the E7.5 *tctp*-mutants exhibited an overall growth deficiency, ranging from minor to extremely severe (Figure 1d and e). No viable mutants were observed beyond E9.5 (Supplementary Table 1).

To study the effect of the *tctp* mutation on cellular proliferation, we measured *in situ* incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine and expression levels of a phosphorylated form of histone H3, a marker of mitosis by immunohistochemistry. The data indicate that the *tctp*-mutant cells proliferate to a lesser extent compared to cells of the control embryos (not shown). To determine if the growth deficit of *tctp*-mutant embryos could also be accounted for by an excess of apoptosis, serially sectioned E6.5 embryos were analyzed by immunohistochemistry using an antibody specific to the cleaved form of caspase-3 (not shown) and TUNEL analysis (Figure 1e). These analyses revealed extensive cell death in the developing mutant embryos.

Western blot analysis using anti-TCTP antibodies detects only one band at the expected molecular weight in protein lysates from mouse embryo fibroblasts (MEFs) (not shown) and various mouse organs (Figure 1f). In the lysates of *tctp*^{Δ3–5/+} (het) animals, the TCTP signal is weaker in intensity, indicating that the *tctp* protein is expressed at lower levels in heterozygous tissues as compared to wildtype (wt) tissues (Figure 1f).

To test whether *tctp* is haploinsufficient in the control of cell proliferation and/or apoptosis, we next measured the cell proliferation capacity and/or the apoptotic response of MEFs and thymocytes prepared from wildtype and heterozygous *tctp*-mutants to various stress conditions. *tctp*^{Δ3–5/+} MEFs proliferated at the same rate in culture and underwent senescence similarly to wildtype controls (not shown). They also exhibited a similar cell cycle distribution and apoptotic response upon UV-C or doxorubicin exposure (not shown). We next measured apoptosis in freshly isolated thymocytes after γ -irradiation and dexamethasone (Dex) treatment. Susceptibility to cell death following DNA-damage in these cells is p53-dependent, whereas apoptosis in response to glucocorticoids (such as Dex) occurs independently of p53. Again, wild-type and heterozygous thymocytes were similarly sensitive to these treatments (not shown). Interestingly, however, we noticed a significant and dose-dependent decrease in TCTP levels in these cells following γ -irradiation (Figure 1g). Together, the data indicate that *tctp* is required for

the survival and proper proliferation of cells during mouse embryonic development. Even if *tctp* levels are reduced in cells from heterozygous mice, *tctp* is not haploinsufficient in the control of cell proliferation and apoptosis. Finally, in response to DNA-damage, *tctp* steady state protein levels dramatically decrease in primary thymocytes, concomitantly with the onset of apoptosis.

The three-dimensional structure of human TCTP. The X-ray structure of human TCTP has been solved and refined at 2.0 Å resolution (Supplementary Table 2). Phases were obtained by molecular replacement, using the coordinates of *Schizosaccharomyces pombe* (*S.pombe*) TCTP (PDB code: 1H7Y) as a probe. The crystallographic asymmetric unit contained four TCTP molecules and 508 water molecules. The X-ray structure of human TCTP confirms a common TCTP fold described previously for *S. pombe* TCTP.²⁰ The structure contains three α -helices (H1, H2, H3) and nine β -strands arranged in two distorted β -sheets, forming two hydrophobic cores (Figure 2). A α -helical hairpin is formed by the two long helices H2 and H3 and protects one face of the central β -sheet. In each subunit, a polypeptide encompassing residues 39–66 is not visible in the electron density map, but certainly protrudes out of the opposite side of the core β -sheet and is presumed to be disordered. In *S. pombe* TCTP, this portion was shown by NMR spectroscopy to be highly mobile.²¹ As noted previously, the TCTP fold has structural similarities with two other proteins: the guanine nucleotide-free chaperone Mss4²⁰ and the methionine sulfoxide reductase gene B (MsrB).²² However, the biological significance of these structural similarities remains unclear.

Comparison of the structure of human TCTP with those of proteins in the Protein Data Bank using DALI yielded a number of other interesting similarities. In particular, the pair of helices H2–H3 bear structural resemblance to the transmembrane domains of diphtheria toxin and bacterial colicins²³ and to the pair of helices H5–H6 in Bcl2 family proteins^{17,24–27} such as Bax,¹⁸ despite negligible amino acid homology. It should be noted that there is no striking amino acid homology between the members of the Bcl2 family in the domain encompassing these H5–H6 (or H6–H7) pore-forming helices but, only a structural similarity.

Besides these two helices, the rest of the protein structure of the Bcl2 family members, including the Bcl2 Homology domains, fit within a common fold, which is not the case for TCTP.

Mutations in helices H2–H3 of human TCTP modify its antiapoptotic function. To investigate whether helices H2–H3 participate in the antiapoptotic function of TCTP, 293T cells were first incubated in the presence of staurosporine, and the levels of TUNEL-positive cells and the extent of PARP cleavage were monitored. TCTP decreases both the levels of TUNEL-positive cells (Figure 3a) and the extent of PARP cleavage (Figure 3b) induced by staurosporine. Strikingly, TCTP also significantly inhibits Bax-induced apoptosis in 293T cells (Figures 3b and d–f) and in N2A cells (data not shown).

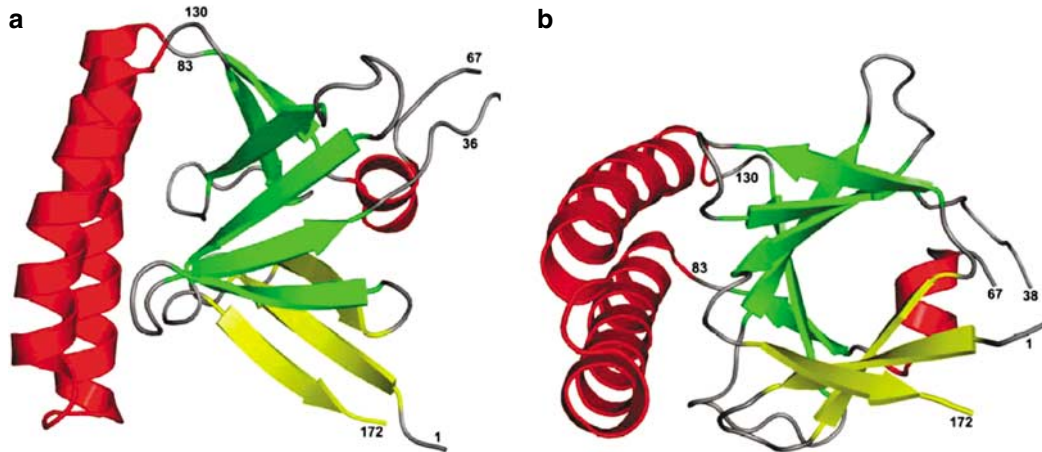


Figure 2 The crystal structure of human TCTP. Two different orientations (a, b) of the molecule are presented showing the two distorted β -sheets in green and yellow and the three α -helices in red. Residues 39–66 belong to a highly mobile polypeptide segment and are not visible in the final electron density map

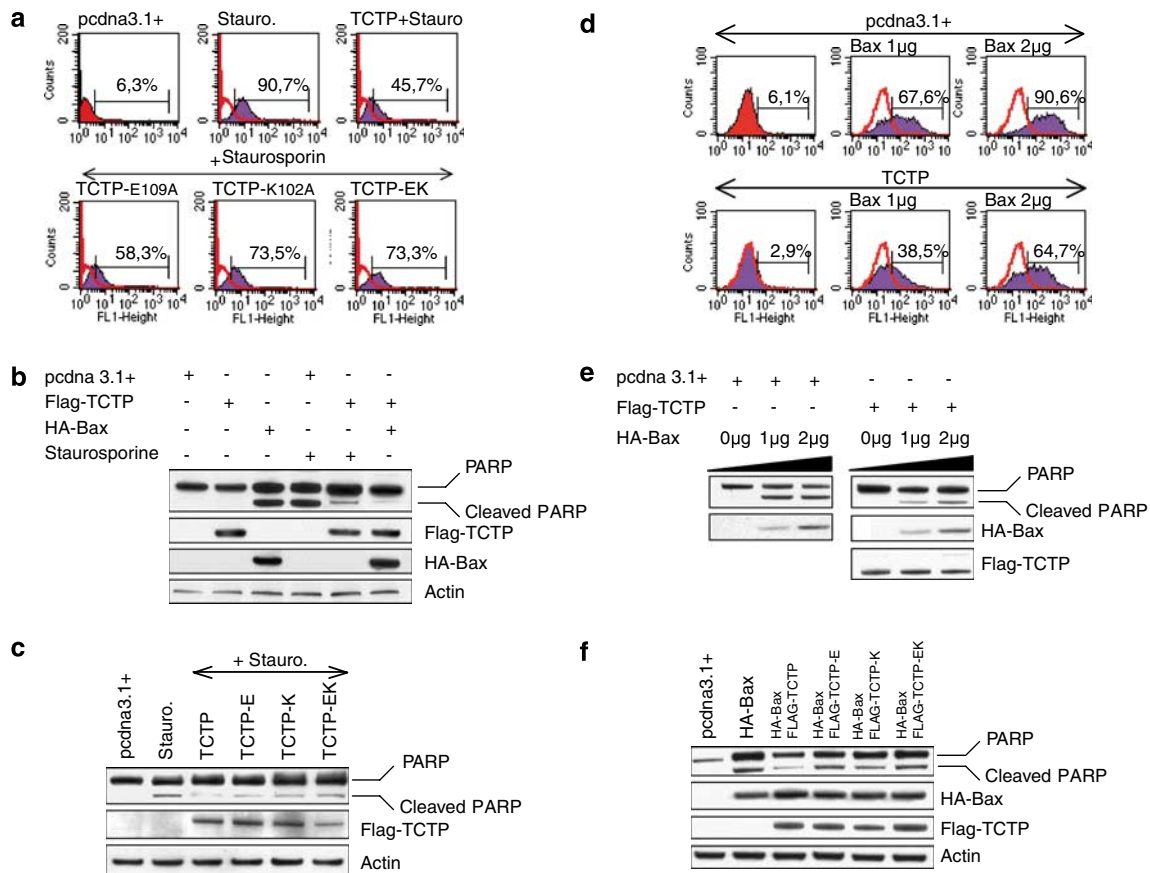


Figure 3 Mutations in helices H2–H3 of human TCTP decrease its antiapoptotic activity against staurosporine- or Bax-induced apoptosis. (a) TUNEL analysis of 293T cells incubated with staurosporine alone, with staurosporine and TCTP or with staurosporine and TCTP mutants. TCTP-EK denotes the double mutation of E109 and K102 to alanine. (b) Western blot analysis of PARP cleavage in 293T cells following staurosporine- or Bax-induced apoptosis in the presence and absence of TCTP. (c) Western blot analysis of PARP cleavage in 293T cells following staurosporine-induced apoptosis in the presence and absence of TCTP or TCTP mutants. TCTP-E denotes the E109A mutation; TCTP-K denotes the K102A mutation; TCTP-EK denotes the double mutation of E109 and K102 to alanine. (d) TUNEL analysis of 293T cells incubated with Bax alone or with Bax and TCTP. (e) Western blot analysis of PARP cleavage in 293T cells following Bax-induced apoptosis in the presence and absence of TCTP. (f) Western blot analysis of PARP cleavage in 293T cells following Bax-induced apoptosis in the presence and absence of TCTP or TCTP mutants. (Same mutants of TCTP as described in c)

We then investigated the effects of mutations of residues (E109 and K102) close to the turn between the two helices H2 and H3 of TCTP (Figure 4). A mutation of the hairpin residue

E109 to alanine alters slightly the effect of TCTP on staurosporine-induced apoptosis, while a mutation of K102 to alanine significantly diminishes the effect (Figure 3a and c).

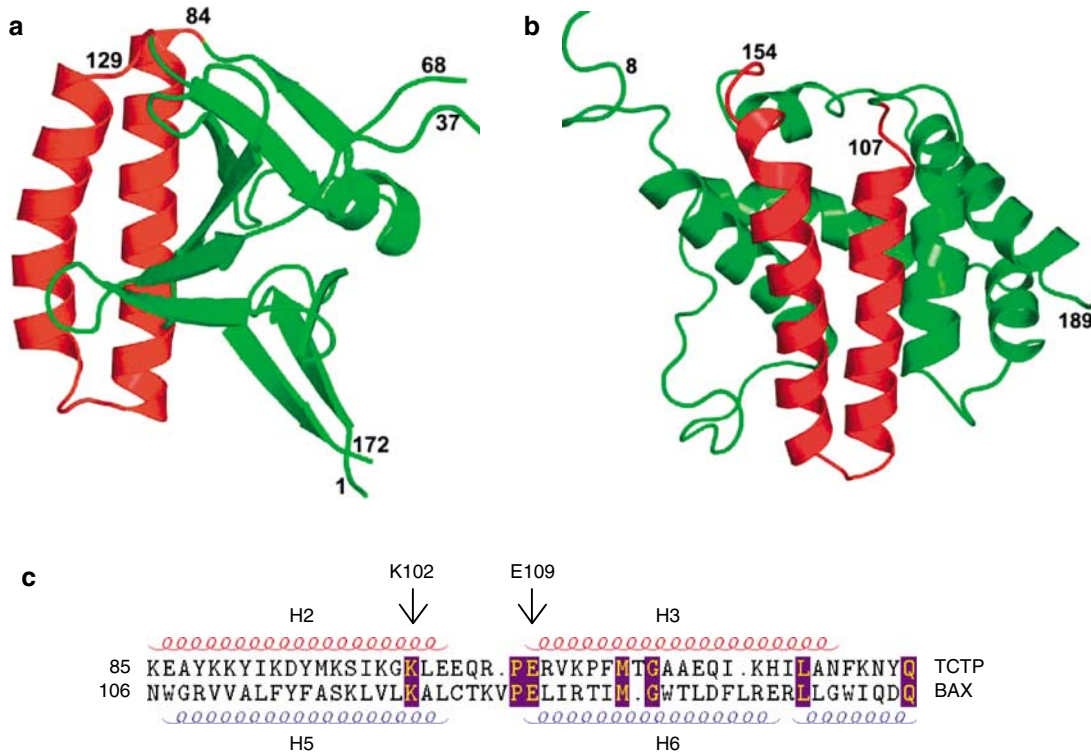


Figure 4 The three-dimensional structures of (a) human TCTP and (b) the pro-apoptotic protein Bax (PDB code: 1F16). The α -helical hairpin (shown in red) common to the two structures is displayed here in a similar orientation. (c) Alignment of the two helical hairpin residues of TCTP (H2, H3) and BAX (H5, H6). The position of the mutated residues is indicated (conserved residues are highlighted in pink)

The effect of the double mutation of E109 and K102 is identical to the effect of the K102A mutation alone. Both single mutants and the double mutant diminish the antiapoptotic effect of TCTP on Bax-induced apoptosis (Figure 3f). Since the helices H2–H3 of TCTP appear to play a role in the protein's antiapoptotic activity, we wished to investigate the effect of replacing helices H5–H6 of Bax by helices H2–H3 of TCTP on the induction of apoptosis. The chimeric protein, BTB (Bax/TCTP H2–H3/Bax), expressed in 293T cells has a strong pro-apoptotic function, comparable to that of wild-type Bax as assessed both by levels of TUNEL-positive cells (Supplementary Figure 1a) and the extent of PARP cleavage (Supplementary Figure 1b). The double mutation in BTB of both residues (K126 the residue corresponding to K102 in TCTP and E133 the residue corresponding to E109 in TCTP) to alanine resulted in a significant reduction in pro-apoptotic strength.

The antiapoptotic function of TCTP occurs at the mitochondria where it inhibits Bax-induced damage. To establish whether or not the antiapoptotic activity of TCTP takes place at the level of the mitochondria in the above experiments, we used an acellular system of purified mitochondria.²⁸ The purified mitochondria were directly incubated (Figure 5a) with the *in vitro* translation (IVT) products of the proteins. The insert in Figure 5a shows the expression of the proteins added. In these assays (Figure 5a, Supplementary Figure 2), TCTP inhibits mitochondrial damage induced by Bax, while the

double mutant of TCTP in which both E109 and K102 are replaced by alanine is much less efficient in inhibiting Bax-induced damage. These results agree well with those obtained by monitoring levels of TUNEL-positive cells and the extent of PARP cleavage and suggest that the antiapoptotic function of TCTP takes place, at least in part, in the mitochondria, with TCTP inhibiting the function of Bax.

TCTP anchors into the mitochondria and inhibits the dimerization of Bax. We further tried to identify how TCTP would 'neutralize' the apoptotic effect of Bax. We first investigated whether wild-type or mutant TCTP binds directly or indirectly Bax. Neither a GST-IVT pull down nor a coimmunoprecipitation of endogenous or overexpressed Bax and TCTP yielded any positive results (data not shown), in agreement with previous reports suggesting that there was no direct interaction between TCTP and Bax.^{4,7} To further evaluate the potential role of TCTP at the level of the mitochondria, we assessed the anchorage of TCTP into the mitochondrial membranes. For that purpose, freshly isolated mitochondria were incubated in the presence of recombinant TCTP and treated with Na₂CO₃, which eliminates loosely bound proteins and spares proteins that are anchored into the membranes. Figure 5b shows that approximately 0.25 pmol TCTP or TCTP-EK (lanes 2, 3) do anchor into 125 μ g of mitochondria. This amount represents less than 1% of the total amount of recombinant TCTP that was allowed to incubate in the presence of the mitochondria. 0.5–20 pmol TCTP were also loaded on the same western blot to allow a

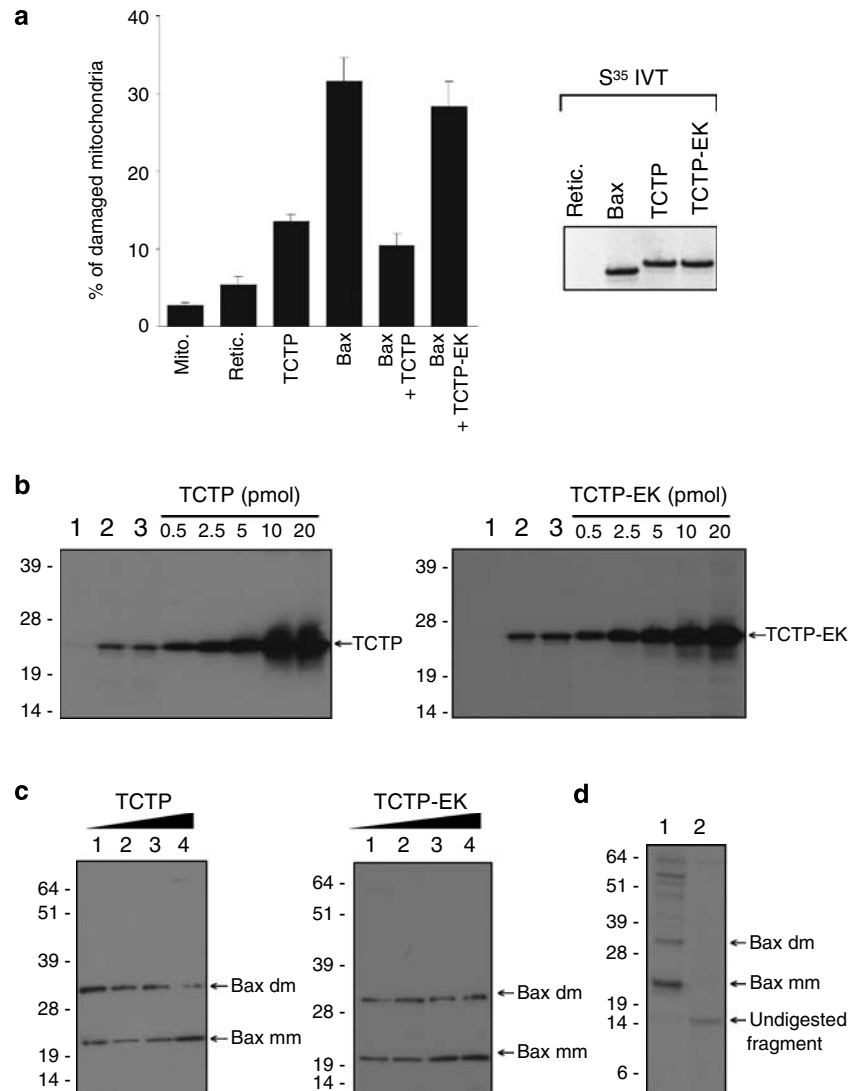


Figure 5 TCTP protects the mitochondria against Bax. **(a)** Analysis of the integrity of the outer mitochondrial membrane (rat liver). The cellular fraction of purified mitochondria was placed in the presence of the *in vitro translation* (IVT) products of TCTP, Bax, Bax and TCTP or Bax and TCTP-EK. Mitochondria alone (Mito). Retic. lysate alone (Retic). The oxidation of cytochrome *c* was used as a marker of mitochondrial damage. Inset: SDS-PAGE showing IVTs. **(b)** Anchorage of TCTP into the mitochondria. Western blot analysis of TCTP (left panel) and TCTP-EK (right panel) anchorage onto the mitochondria. Lane 1: mitochondria (125 μ g), lanes 2 and 3 mitochondria (125 μ g) incubated in the presence of 100 pmol TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel), washed and treated with Na_2CO_3 . Increasing amounts of TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel) were loaded to evaluate quantitatively the anchorage. **(c)** Bax dimerization. Western blot analysis of Bax anchorage into the mitochondria after treatment by increasing amounts of TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel). Lane 1: no treatment, lanes 2, 3 and 4 respectively treated with 5, 10 and 20 nM of TCTP (left panel) or TCTP EK (right panel). Arrows indicate Bax monomer (Bax mm) or Bax dimer (Bax dm). **(d)** Trypsin digestion assay. Western blot analysis of Bax anchorage into the mitochondria without (lane 1) or after trypsin digestion (lane 2)

quantitative comparison. No difference between TCTP and TCTP-EK could be detected with regard to their anchorage capacity into the mitochondria. The anchorage of proteins into the mitochondrial membrane is a well regulated process.²⁹ As documented in Supplementary Figure 3, Bax anchors into the mitochondrial membrane only when activated by tBid. tBid binds loosely, is sensitive to alkali treatment and thus is not anchored into the mitochondrial membrane.²⁹

We then analyzed whether the anchorage of TCTP could interfere with the pro-apoptotic function of Bax. Figure 5c (left panel) indicates that increasing amounts of TCTP do not inhibit the anchorage of Bax monomers but do inhibit the dimeric form of anchored Bax. On the other

hand, TCTP-EK (Figure 5c right panel) does not inhibit the formation of this dimeric form indicating that intact helices of TCTP are necessary to interfere with the dimerization process of Bax when already anchored into the mitochondrial membranes. tBid and TCTP (or TCTP-EK) alone do not generate any Bax signal (data not shown). To consolidate the fact that the 30–35 kDa band, recognized by the polyclonal rabbit anti-Bax antibodies, corresponds to a dimeric form of Bax, we performed a trypsin digestion assay. Trypsin digestion is highly efficient on a wide variety of proteins among which is the monomeric form of Bax. In contrast, the dimeric form of Bax is resistant to complete digestion by trypsin, sparing a fragment of 15 kDa that is recognized

by this antibody which was directed against a synthetic peptide corresponding to amino acids 43–61 of human Bax (Figure 5d lane 2) (Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, and Martinou JC. *Cell Death Differ* (in press)). Monoclonal anti-Bax antibodies directed against amino acids 3–16 of Bax do not recognize this 15 kDa undigested peptide, since this region has been digested by trypsin (data not shown). Together, these results suggest that the 30–35 kDa band corresponds to Bax dimers. Nevertheless this assay does not allow discrimination between a homo- or heterodimeric form of Bax.

Discussion

Since the discovery of TCTP by Yenofsky, it became clear that this protein is implicated in multiple biological processes (Figure 6a) such as cell growth, division, proliferation, and inhibition of programmed cell death.^{2–14,16} It also functions as a histamine releasing factor¹⁵ and is secreted through the non-classical exosome pathway interacting with TSAP6, a p53-regulated gene.^{30,31} It seems that all these different functions of TCTP are related to specific association with various protein partners. The cell growth regulatory function of TCTP is related to its guanine nucleotide dissociation inhibitor

activity for the elongation factors EF1A and EF1B β .³² We previously suggested that by inhibiting the dissociation of GDP from these two components of the translational machinery, TCTP would slow down the elongation process, this way avoiding 'skipping' and finally rendering elongation more efficient. A second observation implicating TCTP in cell growth, was recently made through the study of *Drosophila* TCTP genetics.¹² This study shows that TCTP would regulate the TSC1 and TSC2 pathway where it would function as a GEF-like protein for Rheb. Being upstream of the mTOR pathway, would place TCTP in a strategic position for regulating cell growth. It is however difficult to reconcile these *Drosophila* results with the yeast, where TSC1 and TSC2 do not exist and where Rheb does not appear to function in mTOR pathway; despite highly elevated levels of TCTP. It is interesting to note that TCTP would be implicated in the processes cell growth, proliferation and survival since this relates so closely to the TSC1, TSC2, mTOR pathway. Regardless of the mechanism involved, the data presented herein confirm an important contribution of TCTP in the control of cell growth and proliferation. Embryos lacking *tctp* fail to grow and mutant cells to proliferate.

The crystal structure of human TCTP is highly similar to that of TCTP from *S. pombe*, confirming the common fold

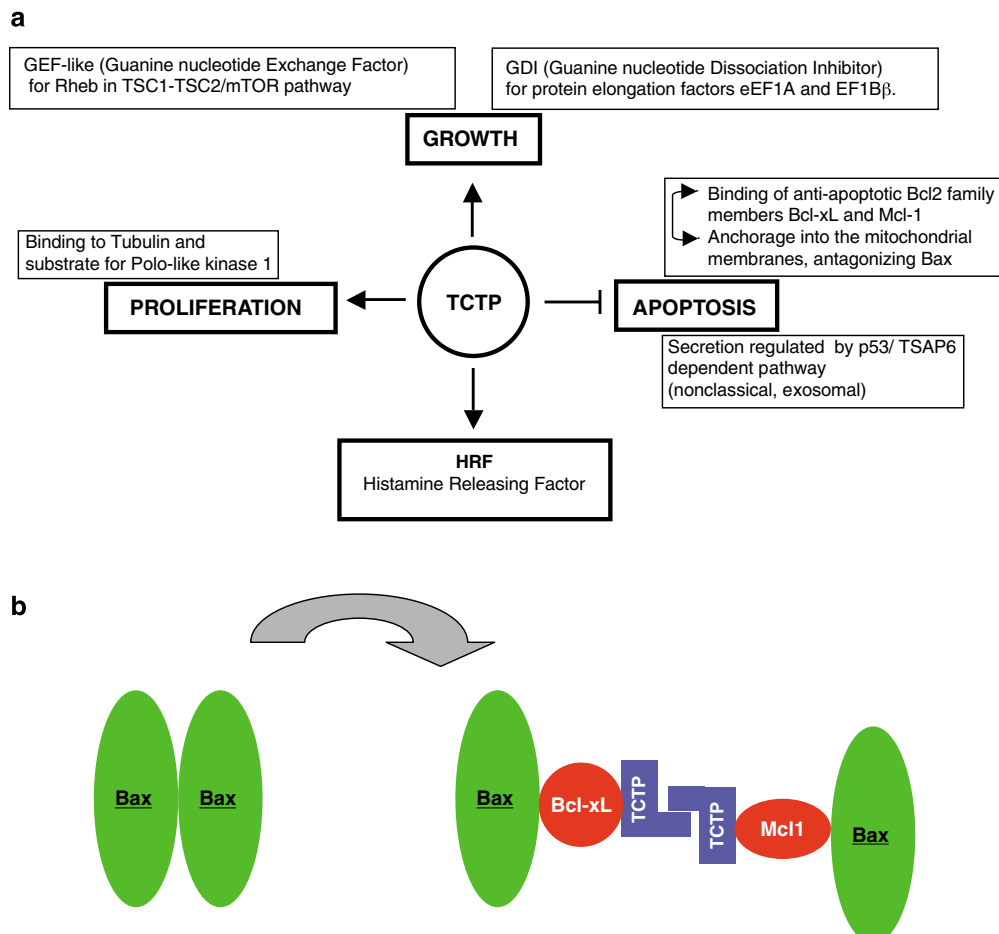


Figure 6 (a) The different functions of TCTP and their potential mechanism of action. (b) Schematic representation of the potential antiapoptotic mechanism of TCTP

expected from the sequence homology.²⁰ As noted previously, TCTP shows structural homology to Mss4, a protein originally described as guanine nucleotide exchange factor for Rab proteins but later identified as a guanine nucleotide-free chaperone.³³ Mss4, however, lacks helices H2–H3, contains a zinc-binding site absent in TCTP and differs in the topological placement of a small β -sheet and a long mobile loop.²⁰ Despite a common core fold, these structural differences and the lack of any clear evidence for functional similarities weaken the suggestion that TCTP and Mss4 families of proteins are related. Similarly, the structural homology with MsrB²² does not seem to extend to any common function, since the catalytic residues of MsrB are absent in TCTP.

Structural analysis of TCTP and members of the Bcl2 family yields some insight into possible mechanisms for the control of apoptotic processes. The structure of Bcl-xL²⁵ revealed a similarity between its H5–H6 and the channel-forming domains of diphtheria toxin and bacterial colicins A and E1.²³ With the determination of a number of structures of proteins from the Bcl2 family,¹⁷ it has become clear that pro- and antiapoptotic members of the family have similar folds with the central core helices H5–H6 flanked by the other α -helices and function as regulators of the mitochondrial membrane permeability where they would influence the opening of specialized pores.^{17,24–27} It is presumed today that the balance between the pro-apoptotic and the anti-apoptotic will define the level of permeability of those pores rather than the helices creating the pores. The crystal structure of TCTP reveals a similar pair of helices and we have sought here to characterize the role of these helices in the antiapoptotic function of the protein.

It has been inferred that TCTP is antiapoptotic since decreasing its protein levels leads to apoptosis or reversion of malignant phenotypes.^{2–7} Importantly, TCTP has been shown to bind to MCL1^{2,4,7} and Bcl-xL,⁶ both antiapoptotic members of the Bcl2 family. TCTP is therefore closely associated with apoptotic processes. We show here that loss of *tctp* expression results in a dramatic increase in apoptotic cell death during embryogenesis. This phenotype, together with the proliferation defect observed in these mutants, is sufficient to explain why the *tctp*-null mice die early during embryogenesis. Of note, another *tctp*-mouse model has recently been generated and the data reported³⁴ are in keeping with these observations. Together, these genetic data clearly highlight a critical role for *tctp* in the control of cell survival *in vivo*. Moreover, mutagenesis of residues in helices H2–H3 of TCTP reduces its antiapoptotic function. The creation of a chimeric protein, BTB, in which the helices H2–H3 of TCTP replace helices H5–H6 of Bax, does not disrupt the pro-apoptotic function of this Bcl2 family protein. Mutations in BTB corresponding to those made in TCTP do however disrupt this activity. Together these results show that the pair of helices function equally well in the context of a pro- or antiapoptotic protein, and that mutations diminish this activity. It may therefore be that the precise molecular event in which the pair of helices participates is similar in the context of TCTP or BTB. Sequence homology for these helices is low even between members of the Bcl2 family, although the helices are structurally and functionally conserved.^{17,24–27} As a result, the

helices are excluded from the definition of the Bcl2 homology domain,¹ yet the similarity found here suggests a structural feature common to a set of proteins involved in apoptotic processes.

Previous immunofluorescence data suggested that TCTP colocalizes with Bcl-xL and MCL1 and therefore acts at the mitochondria, similarly to other key regulators of apoptosis. However, the high abundance of TCTP in the cytoplasm renders interpretation of those data rather complicated. For this reason we used a purified fraction of mitochondria to perform our experiments. Our data indicate that TCTP antagonizes the function of Bax and requires its pair of helices to participate in antiapoptotic activity at the level of the mitochondria. Nevertheless, it is clear that those H2–H3 helices are not *per se* required for the binding and anchorage of the protein into the mitochondria as revealed by the mutant TCTP-EK, which binds and anchors as efficiently as wild-type TCTP to the mitochondria. There are at least two possible interpretations to explain this weakening of mutant TCTP. It is possible that while the amount of TCTP and TCTP-EK protein binding and anchoring in the mitochondria remain similar, the conformation of the protein in the membrane and its binding to MCL1 and Bcl-xL would be affected. It is also possible that the mutation of these helices would impair to some extent the dimerization of TCTP.

The 'rheostat' model suggests that the balance between pro- and antiapoptotic members of the Bcl2 family determines the fate of a cell. However, this model is not sufficient to explain our results because TCTP does not bind directly to Bax (Liu *et al.*, 2005⁴; Zhang *et al.*, 2002⁷; our results). We therefore propose that TCTP would bind antiapoptotic members of the Bcl2 family, as described for MCL1^{2,4,7} and Bcl-xL,⁶ and possibly arrange them in such a way into the mitochondrial membranes that their antiapoptotic action would be more efficient. We suggest that this is the 'enhancer' part of the model that would regulate the efficiency of the 'rheostat'. Furthermore, we suggest that TCTP would anchor into the mitochondrial membrane and inhibit the formation of dimeric Bax. One possible interpretation of this would be that TCTP, following its anchorage into the membrane, would separate and distance Bax homodimers (Figure 6b), but this necessitates further investigation.

Materials and Methods

Generation of *tctp* knockout mice and genotyping. Genomic DNA was prepared from 129/Svj ES cells using established procedures. PCR was performed using expand long template (Roche, France) in buffer 1 following the manufacturer's recommendations.

Three fragments (a, b and c) overlapping 8,8 kb of the genomic region containing the murine *tctp* gene on chromosome 14 were amplified using following primers:

- F(a) 5'-GATGCGGCCGCCTGTCCATTAGAGTACCGG-3',
R(a) 5'-CTCGATATCCCTGAAACATCTTAACCTACC-3',
F(b) 5'-AGGGATATCGAGCTGACTGATCGTTGCCGG-3'
R(b) 5'-TTCGGATCCCACAGTTATTATACAACCCCT-3'
F(c) 5'-GTGGGATCCGAAAAAGTCTGTTTGTCTGTCT-3'
R(c) 5'-CTCGTCGACGGGGCGTTGCTCACTGAGAG-3'

These 3 amplicons were cloned in a pBluescript (pBS) vector digested with *NotI*/*SalI*. One 46 bp oligonucleotide containing a *LoxP* site flanked by 2 *EcoRV* sites and one neomycin resistance gene with one *LoxP* site at each end were cloned respectively in 5' of exon 3 and in 3' of exon 5. This construct was linearized and injected into C57Bl6 ES cells to obtain recombinant mice in which the exons 3, 4 and 5 were excised upon Cre-mediated recombination.

Genotyping was performed on genomic DNA from mouse tails or yolk sacs. A PCR-based strategy was developed to distinguish between the wild-type and *tctp* mutant alleles. The primers are as follows (see Figure 1a):

F1 5'-GAGTGACCACCTCTCTCAGTCC-3'

R1 5'-AACACCGGTGACTACTGTGCTTTTCG-3'

F2 5'-GGGAGTGACGACGATGATCTTTGCC-3'

R2 5'-AAGGCACTGTCTCCACCAGTCCC-3'

When primers F1, R1 and R2 are used in the same reaction (see Figure 1c), a 423 bp fragment indicates the presence of the mutated allele (*tctp*^{Δ3-5}), whereas 300 bp fragment is amplified from the wild-type allele (see Figure 1b).

Mouse embryo fibroblasts were prepared from 12.5-days-old embryos using established procedures. Cells and organs were lysed in hypertonic buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT and 1% NP40).

Histology. For sectioning, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde/1 × PBS overnight, paraffin embedded, sectioned and stained in hematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry and TUNEL assay. The following antisera were used: anticaspase-3 (1/200, Cell Signaling); antiphosphorylated histone-H3 (PH3) (1/200, Upstate). Avidin-conjugated peroxidase (ABC and DAB kits from Vector Laboratories) was used for immunodetection. TUNEL assay was used to detect apoptotic cells on sections of paraffin-embedded embryos using the 'In Situ Death Detection Kit' (TmR red, Roche). After TUNEL staining, embryo sections were counterstained and mounted using Vectashield with DAPI (Vector H-1200).

Crystallization and data collection. Initial crystallization conditions were found by screening different precipitating agents. Different crystal forms were crystallized by the hanging drop vapor-diffusion method at 4°C using polyethylene glycol (PEG) 5000 MME as the crystallization agent. Crystallization trials were set up using equal volumes of protein (concentrated to 3 mg/ml) and reservoir. The best crystals were grown against a reservoir containing 25% PEG 5000 MME, 50 mM Bis Tris (Bis(2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane) buffer pH 6.2, 50 mM magnesium acetate and 3% 1,6-hexanediol. These crystals diffracted beyond 2.0 Å resolution at the European Synchrotron Radiation Facility ID14-1 beam line, and belong to the monoclinic space group P2₁, with unit-cell parameters a = 63.8, b = 93.7, c = 70.4 Å, β = 114.9. A complete data set was obtained from a single crystal cooled to 140 K from 150 frames of 1° oscillation (wavelength of 0.934 Å, crystal-detector distance of 180 mm) using an ADSC Q4R CCD detector. The estimated V_m of 2.3 Å³/Da indicates four molecules of TCTP in the asymmetric unit and corresponds to a solvent content of 47%, assuming a protein density of 1.22 g/cm³. Data were processed with the package HKL2000.³⁵

Structure determination. The structure of human TCTP was solved by the molecular replacement method (Program MOLREP, AMoRe supplemented in CCP4³⁶) using the NMR coordinates of *S. pombe* TCTP (PDB code: 1H7Y). The refined model contains four human TCTP molecules of 155 residues (residues 39–66 are not visible in the final electron density map) and 508 water molecules. The crystallographic R-factor is 19.1% using all reflections between 25 and 2.0 Å with no sigma cutoff (R_{free} = 23.8%, using a random sample containing 7.5% of the data). The models were refined with the CNS program,³⁷ using the Engh and Huber stereochemical parameter set. All rebuilding and graphics operations were done with O and related Uppsala programs.³⁸ All crystallographic calculations were carried out with the CCP4 package.³⁶ The stereochemistry of the model was inspected using Procheck³⁹ and the quality of the refined structure was assessed using the Biotech validation suite for protein structures.⁴⁰ In each monomer, 92.9% of the residues are in the most favored regions of the Ramachandran plot (7.1% in additional allowed regions). Data collection statistics and refinement statistics are presented in Supplementary Table 2.

Coordinates of human TCTP at 2.0 Å resolution have been deposited in the Protein Data Bank (accession code: 1YZ1).

Figures were prepared with PyMOL (Delano Scientific, <http://www.pymol.org>) and TeXshade.

Expression constructs and mutagenesis. The coding regions of human Bax-α and human TCTP were cloned into the *EcoRI* and *XhoI* sites of the plasmid vector pCDNA3.1. (Invitrogen), with a HA tag and a Flag tag respectively. BTB was obtained by replacing Bax H5 and H6 helices by TCTP H2 and H3 helices.

BTB sequence:

MDGSQEQRGGGPTSSEQIMKTGALLQQFIQDRAGRMGGEAPELALDVPV
QDASTKKLS

ECLKRIGDELDSNMELQRMIAAVDTDSPREVFVRAADMFSDGNFNTGKEYA
KKYIKDYM

KSIIKGKLEEQRPERVKPFMTGAAEQIKHILRTGWIQDQGGWDGLLSYFGTPT
WQVTIVFV

AGVLTASLTIWKKMG*

This BTB sequence corresponds to the following construction: BAX_{1–106}; TG, TCTP_{85–126}; RT, BAX_{150–192}. The TCTP insert has been underlined in the BTB sequence above.

TCTP mutants TCTP-E109A, TCTP-K102A, TCTP-EK and BTB mutants BTB-E133A, BTB-EK were obtained using QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene) following the manufacturer's protocol. All mutants were confirmed by automated DNA sequencing.

Purification of recombinant protein. Full-length TCTP cDNA was cloned in-frame in the pGEX-6P vector (GE Health Care). Expression of the GST-fusion protein in BL21 (DE3) bacteria strain (Stratagene) was induced by the addition of 0.1 mM IPTG for 16 h at room temperature. Cells were lysed for 30 min in a 1% Nonidet P-40 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, plus the protease inhibitors 1 mM AEBSF, 1% aprotinin, 1 mM leupeptin, and 2 mM pepstatin (all reagents from ICN)). The lysates were clarified by sonication and centrifugation (16 000 × g) for 30 min at 4°C, and the GST-fusion protein was purified with glutathione-sepharose beads (GE Health Care). The beads were washed three times with the 1% Nonidet P-40 buffer and TCTP protein was cleaved from GST tag by Prescission protease (GE Health Care). The quality of the purified protein was assessed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The purified protein was dialyzed and stored at 4°C in 50 mM Hepes pH 7 and 100 mM NaCl.

Cell culture. 293T cells were maintained in DMEM containing 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) penicillin-streptomycin-glutamine. 293T cells were transiently transfected by the calcium phosphate method. In all experiments, carrier DNA was added to maintain equal plasmid concentrations between different samples.

Antibodies. Rabbit anti-TCTP antibodies were generated against the human protein TCTP. The corresponding polyclonal antiserum was affinity-purified on a column coupled with the protein (Agro-Bio). This antibody is used at a 1/4000 dilution in western blot analysis. Goat anti-Actin 119 antibody (Santa Cruz Biotechnology) or mouse monoclonal anti-γ-tubulin (SIGMA) was used at 1/1000 for equal loading. Secondary antibodies, antigoat, antirat, antirabbit or antimouse HRP-linked (Calbiochem) were used at a 1/5000 dilution. Anti-cytochrome c (6H2) and anti-Smac (V17) (Santa Cruz Biotechnology), anti-HA (Babco), anti-Flag (M2, Sigma), anti-PARP (C2.10, ICN), anti-MTCo1 (ab14705, abcam), anti-Bax (Pharmingen).

Flow cytometry. The TUNEL assay was performed using an *In Situ* Cell Death detection kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions and cells were analyzed in a FACScan cell sorter (Becton Dickinson).

Binding of TCTP to the mitochondria and cytochrome c oxidase assay. Mitochondria were isolated²⁸ from normal rat liver using a mitochondria isolation kit (Sigma Aldrich). For mitochondrial targeting assays, [³⁵S]Met-labeled proteins (GE Health Care) were synthesized from cDNAs using the TNT-coupled Transcription/Translation system (Promega, France). Radio-labeled Bax, TCTP, TCTP-EK, were incubated with isolated mitochondria (2.5 mg proteins/ml) at 30°C for 1 h in 40 μl of standard import buffer (250 mM sucrose, 80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM malic acid, 8 mM succinic acid, 1 mM ATP-Mg²⁺, 20 mM MOPS, pH 7.5). Where indicated, ³⁵S-Bax was pre-incubated with radiolabeled TCTP or TCTP-EK for 30 min prior to incubation with mitochondria. The integrity of the outer membrane was assessed by measuring cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes in the presence and absence of a detergent, *n*-dodecyl-D-maltoside, one of few detergents that allows the cytochrome c oxidase dimer to be maintained in solution at low detergent concentrations. The ratio between activity in the presence and absence of the detergent is a measure of the integrity of the mitochondrial outer membrane. The assay was performed using a cytochrome c oxidase assay kit (Sigma), according to the manufacturer's instructions. Alternatively, cytochrome c was detected in the supernatant of the mitochondria by western blot analysis using anti-cytochrome c antibodies.

Anchorage assay of TCTP into the mitochondrial membrane. Mitochondria were purified from rat liver by differential centrifugation. 125 μ g of freshly prepared mitochondria were incubated in the presence of 5–20 nM recombinant TCTP or TCTP-EK at 30°C for 10 min. Samples were washed and treated with Na₂CO₃ followed by centrifugation at 100 000 \times g for 1 h.²⁹

Bax dimerization assay. Mitochondria preparation and incubation with TCTP (20 nM) or TCTP-EK (20 nM) were performed as above. Hereafter, recombinant tBid (5 nM) was added for 5 min at 30°C, followed by an incubation with recombinant Bax (10 nM) for 7 min at 30°C. Na₂CO₃ treatment was performed as above followed by western blot analysis.

Trypsin digestion assay. 250 μ g of freshly prepared mitochondria were incubated in the presence of Bax (100 nM) and tBid (10 nM) for 10 min at 30°C and treated with Na₂CO₃ as above. Samples were resuspended in 50 μ l KCl buffer and 10 μ g of trypsin was added. Digestion occurred for 2 h at 30°C and analyzed by western blot using the polyclonal rabbit antibody directed against the amino acids 43–61 of human Bax (Pharmingen) (Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, and Martinou JC. *Cell Death Differ* (in press)). This antibody detects the undigested 15 kDa fragment of Bax dimers.

Acknowledgements. This study is part of the PhD thesis of Dominique Duflaut (Université Paris XI) and Alexandra Lespagnol (Université Paris VII). We thank the staff of the European Synchrotron Radiation Facility beam line ID14-1 for use of their synchrotron instrumentation and help during data collection. We are in debt to Pierre Chambon for his longstanding support and grateful to Tania Sorg and Daniel Metzger for their help and advice in the generation of the tctp knockout mice. CB is supported by a grant from the Belgian Foundation for Cancer Research.

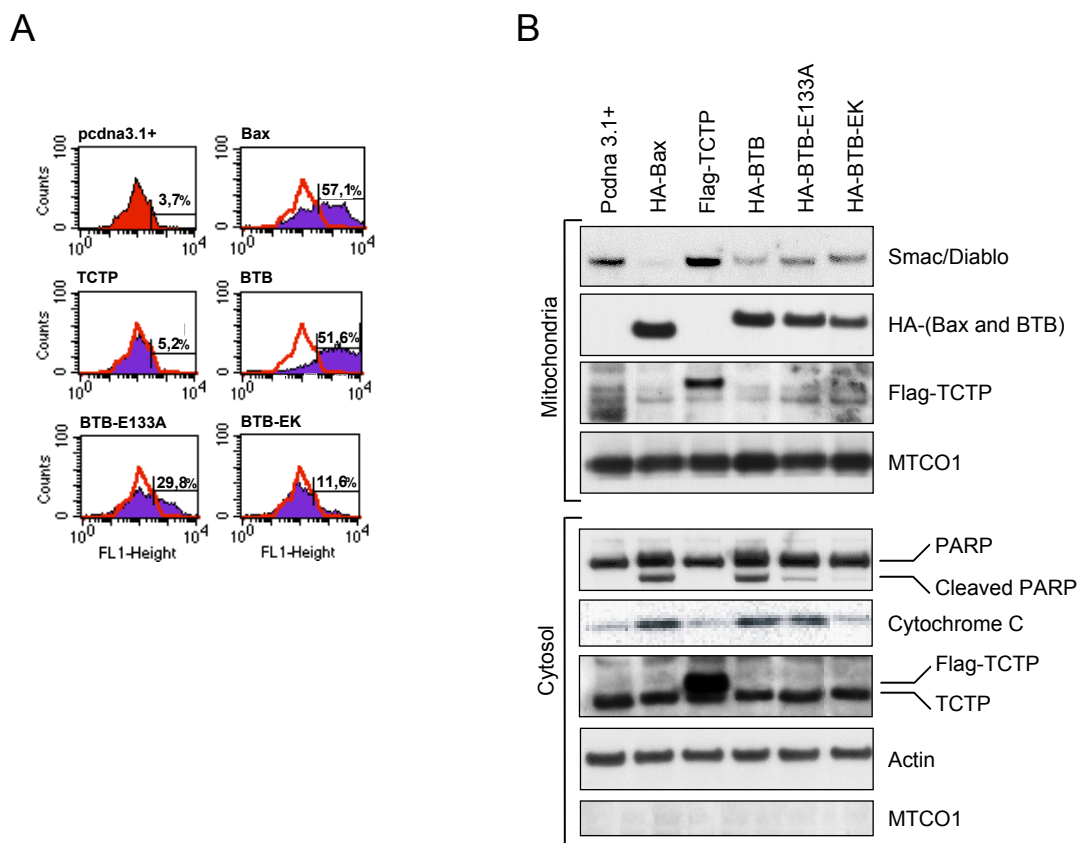
Competing interest statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

- Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**: 205–219.
- Graidist P, Phongdara A, Fujise K. Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004; **279**: 40868–40875.
- Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47542–47549.
- Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3117–3126.
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R *et al*. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 14976–14981.
- Yang Y, Yang F, Xiong Z, Yan Y, Wang X, Nishino M *et al*. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 2005; **24**: 4778–4788.
- Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan ZH, Fujise K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37430–37438.
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 2350.
- Bommer UA, Lazaris-Karatzas A, De Benedetti A, Nurnberg P, Benndorf R, Bielka H *et al*. Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23: involvement of eIF-4E. *Cell Mol Biol Res* 1994; **40**: 633–641.
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1983; **3**: 1197–1203.
- Norbeck J, Blomberg A. Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast* 1997; **13**: 1519–1534.
- Hsu YC, Chem JJ, Cai Y, Liu M, Choi KW. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 2007; **445**: 785–788.
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci* 1999; **112** (Part 8): 1257–1271.
- Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6209–6221.
- MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995; **269**: 688–690.
- Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S *et al*. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15364–15369.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 83–94.
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; **103**: 645–654.
- Fiucci G, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Beaucourt S, Duflaut D, Susini L *et al*. Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene. *Genomics* 2003; **81**: 570–578.
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; **8**: 701–704.
- Baxter NJ, Thaw P, Higgins LD, Sedelnikova SE, Bramley AL, Price C *et al*. Backbone NMR assignment of the 19 kDa translationally controlled tumor-associated protein p23fyp from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biomol NMR* 2000; **16**: 83–84.
- Lowther WT, Weissbach H, Etienne F, Brot N, Matthews BW. The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat Struct Biol* 2002; **9**: 348–352.
- Elkins P, Bunker A, Cramer WA, Stauffacher CV. A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 1997; **5**: 443–458.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW *et al*. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; **385**: 353–357.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS *et al*. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335–341.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M *et al*. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5113–5118.
- Matsuyama S, Schendel SL, Xie Z, Reed JC. Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices. *J Biol Chem* 2005; **273**: 30995–31001.
- Cartron PF, Olivier H, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10587–10598.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 929–935.
- Amzallag N, Passer BJ, Allanic D, Segura E, Thery C, Goud B *et al*. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 46104–46112.
- Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Le Gall I *et al*. 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 USA* 1996; **93**: 3953–3957.
- Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N *et al*. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13892–13897.
- Nuoffer C, Wu SK, Dascher C, Balch WE. Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1305–1316.
- Chen SH, Wu PS, Chou CH, Yan YT, Liu H, Weng SY *et al*. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 2525–2532.
- Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 1997; **276**: 307–326.
- Collaborative Computational Project. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994; **50**: 760–763.
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW *et al*. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998; **54** (Part 5): 905–921.
- Kleywegt GJ, Jones TA. Efficient rebuilding of protein structures. *Acta Cryst* 1996; **D52**: 829–832.
- Laskowski RA, Mac Arthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. *J Appl Crystallogr* 1993; **26**: 283–291.
- Wodak SJ, Pontius J, Vaguine A, Richelle J. *Validating Protein Structures. From Consistency Checking to Quality Assessment*. SERC Daresbury Laboratory: Warrington, UK, 1995.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

Supporting figures, which were published as supporting information on the CDD web site.

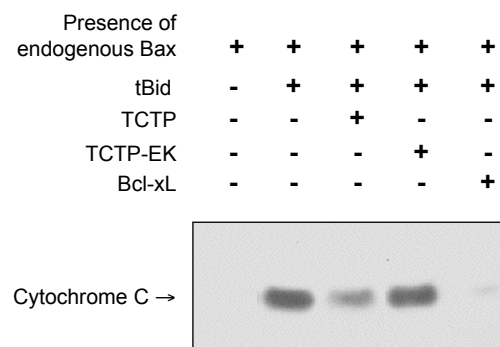


Supplementary Figure 1.

Effects of the chimeric protein BTB on apoptosis.

A. TUNEL analysis of 293T cells transfected with Bax, TCTP, BTB or BTB mutants. B. Western blot analysis of 293T cell extracts following induction of apoptosis by Bax, BTB or BTB mutants. Actin was used to evaluate equal loading and MTCO1 as a marker of fractionation between mitochondria and the cytosol.

Supporting figures, which were published as supporting information on the CDD web site.

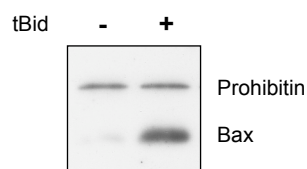


Supplementary Figure 2.

Effect of TCTP and TCTP EK on the Cytochrome C release from mitochondria.

Western blot analysis of Cytochrome C on the supernatant of mitochondria (250 μ g) purified from HeLa cells. Activation of endogenous Bax was obtained by tBid. Incubation was performed in the absence (-) or presence (+) of t-Bid (10 nM) and in the absence (-) or presence (+) of TCTP (1 μ M) or TCTP EK (1 μ M). BclxL (1 μ M) is used as a positive control for inhibition of apoptosis.

Supporting figures, which were published as supporting information on the CDD web site.



Supplementary Figure 3.

Bax activated by tBid anchors into the mitochondrial membranes.

Western blot analysis of Bax and Prohibitin. Purified rat liver mitochondria (100 mg) were incubated with Bax (100 nM), in the absence (-) or presence (+) of tBid (10 nM), washed and treated with Na₂CO₃. Endogenous Prohibitin was used as control for equal loading of mitochondria.

Supporting tables, which were published as supporting information on the CDD web site.

Table 1: Genotyping Analysis of Progeny from <i>TCTP</i> Heterozygous Intercrosses								
Stage	No. Of Litters	Total No.	+/+	+/-	-/-	-/- (%)	Abnormal	Abnormal (%)
E 6.5	2	12	ND	ND	ND		2	17
E 8.5	3	18	ND	ND	ND		5	28
E 9.5	2	11	3	5	3	27	3	27
F2	14	99	29	70	0	0	0	0

ND: Not Determined

Supplementary Table 1.

Supporting tables, which were published as supporting information on the CDD web site.

Table 2: Data collection and refinement statistics	
	Crystal 1 TCTP
Data collection	
Space group	P2 ₁
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	63.8, 93.7, 70.4Å
α , β , γ (°)	90., 114.9, 90.
Resolution (Å)	2.0
<i>R</i> _{merge} (%)	4.0 (15.4)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	24.5 (7.2)
Completeness (%)	98.3 (98.3)
Redundancy	2.8 (2.6)
Refinement	
Resolution (Å)	25-2.0
No. Reflections	49288
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.191 / 0.238
No. atoms	
Protein	4778
Water	508
<i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	29.0
Water	38.0
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.4

¹ The values for the highest resolution shell are given in parentheses.

Supplementary Table 2.

RESULTATS PRELIMINAIRES.

Mécanisme d'action de la Sertraline et de la Thioridazine.

En fonction des résultats de cytotoxicité, de l'effet anti-tumoral chez les souris et de l'effet sur la baisse d'expression de TCTP, la suite des études pharmacologiques ont été faites avec la Sertraline et la Thioridazine (Tuynder et al., 2004). Comment ces drogues fonctionnelles elles ? Agissent-elles directement sur TCTP ? Comment la protéine TCTP est éliminée ? Ce sont les questions auxquelles on a essayé de répondre.

La possibilité que ces drogues se lient directement à TCTP a été testé par RMN et par Biacore (Fig. 55).

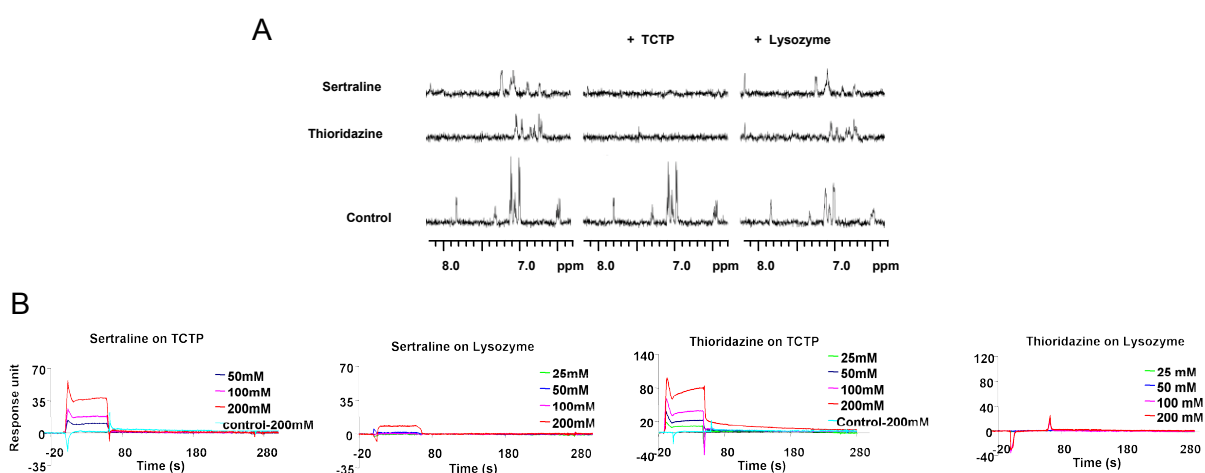


Figure 55 : Liaison de TCTP avec les drogues Sertraline et Thioridazine.

A : analyse par RMN de la liaison des drogues à TCTP. Le lysozyme sert de contrôle. **B :** analyse par Biacore de la liaison des drogues à TCTP.

Par RMN, la liaison de la Sertraline et la Thioridazine sur la protéine TCTP induit une modification du spectre. Il y a une atténuation de la résonance alors que les drogues n'ont aucun effet sur le lysozyme. L'histamine est utilisée comme contrôle de drogue et n'a également aucun effet sur TCTP ou le lysozyme. Par Biacore, on montre que la Sertraline lie TCTP avec un K_d (constante de dissociation) de $125\mu\text{M}$ et que la Thioridazine lie TCTP avec un K_d de $59\mu\text{M}$. Ces constantes de dissociation sont faibles, c'est certainement pour cette raison qu'elles n'ont pas pu être déterminées par des méthodes plus classiques comme la dialyse à l'équilibre ou par filtration. L'analyse par Biacore a permis de déterminer que la stœchiométrie est d'une molécule de drogue pour une molécule de TCTP laissant présager qu'il s'agit d'une liaison spécifique.

Ensuite, on s'est intéressé à la diminution de TCTP. Comment celle-ci est-elle éliminée de la cellule ? L'étude des voies classiques de dégradation par le protéasome n'a rien donné. En fonction de nos connaissances sur TCTP, on a regardé les voies de sécrétion et on a constaté que dans de nombreux modèles cellulaires, la Sertraline et la Thioridazine induisent la sécrétion de TCTP (Fig. 56). En parallèle de la baisse de niveau de TCTP dans la cellule,

étonnamment ces drogues augmentent le niveau de TSAP6. Dans nos travaux précédents, on montrait que la surexpression de TSAP6 induisait une augmentation de la sécrétion de TCTP par les exosomes, on a donc voulu voir si une partie du TCTP qui était sécrétée pouvait l'être par les exosomes. Contrairement à ce qu'on aurait pu penser, ni la quantité d'exosomes sécrétés, ni la concentration de TCTP dans ces exosomes n'augmentent en présence de drogues. Comme si les drogues avaient bloquées cette voie de sécrétion.

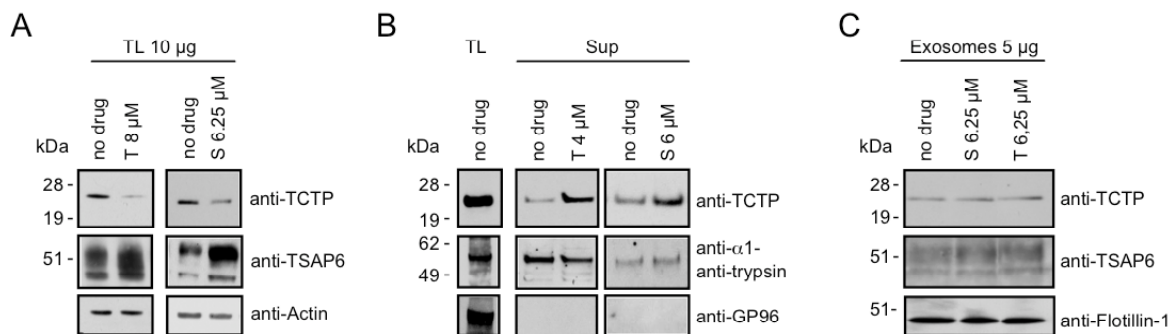


Figure 56 : Effet des drogues Sertraline et Thioridazine sur la sécrétion de TCTP.

A : analyse par Western-Blot de l'expression de TSAP6 et TCTP dans un lysat de cellules traitées avec la Sertraline (S) ou la Thioridazine (T) pendant 24Hrs aux concentrations indiquées. L'actine sert de contrôle de dépôt. **B :** analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP dans le surnageant de cellules traitées pendant 3Hrs avec les drogues dans un milieu sans sérum. L' α 1-anti-trypsin sert de contrôle de dépôt alors que le GP96 sert de contrôle de purification. **C :** analyse par Western-Blot de l'expression de TCTP, TSAP6 et Flotillin-1 dans 5 μ g d'exosomes purifiés à partir de MEFs traitées pendant 24Hrs.

Pour essayer de comprendre ces données et sachant que TSAP6 se lie à TCTP et que TSAP6 régule la sécrétion de TCTP par les exosomes on a regardé l'état du complexe TSAP6-TCTP en présence des drogues. La protéine TSAP6 soluble se lie sur la protéine TCTP immobilisée sur les sensor chips et inversement la protéine TCTP soluble se lie sur la protéine TSAP6 immobilisée avec une constante d'affinité de l'ordre du μ M (**Fig. 57**). La formation du complexe TCTP-TSAP6 est inhibée par la présence de la Sertraline et la Thioridazine alors que les drogues seules ne se lient pas à TSAP6.

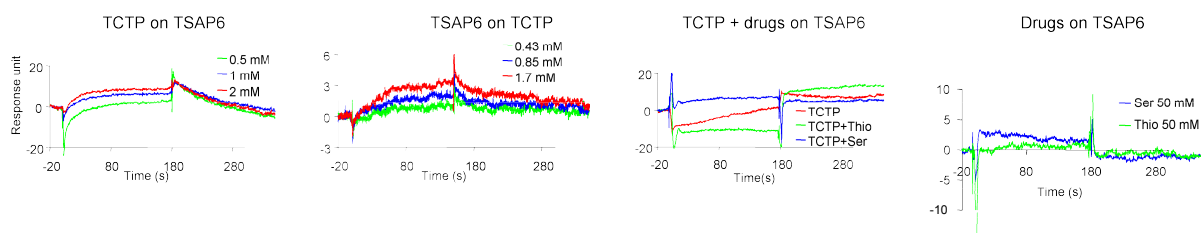


Figure 57 : Les drogues Sertraline et Thioridazine inhibent l'interaction TCTP-TSAP6.

Analyse par Biacore de la liaison de TCTP à TSAP6 en présence des drogues Sertraline et Thioridazine.

Ces résultats permettent de répondre à une première question comment TCTP est éliminée suite à l'action des drogues ? Il semblerait que TCTP soit sécrétée par des voies de sécrétion non-classique mais pas par la voie des exosomes comme on aurait pu s'y attendre. La Sertraline et la Thioridazine inhibent l'interaction TSAP6-TCTP et empêchent la sécrétion de

TCTP par les exosomes. Ces drogues induisent également une augmentation du niveau de TSAP6. Est-ce une action directe sur l'expression ou une conséquence au fait que la voie de sécrétion par les exosomes soit compromise ? Cette étude ne nous permet de conclure sur ce point.

L'hypothèse serait que ces drogues inhibent la formation du complexe TSAP6-TCTP et qu'elles forcent TCTP à emprunter une autre voie de sécrétion que celle des exosomes.

7 - DISCUSSION

Comment une cellule tumorale devient-elle une cellule révertante ? C'est la question à laquelle Adam Telerman et Robert Amson essayent de répondre. Leur objectif est de comprendre les mécanismes de la réversion tumorale afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Avec une fréquence rare d'une cellule sur un million, une cellule peut réverter de son état tumoral vers un état malin atténué. Par quel mécanisme l'état tumoral d'une cellule peut-il être atténué ? Mon travail de doctorat a consisté à étudier les fonctions de trois gènes : *siah-1b*, *tsap6* et *tctp* identifiés dans les modèles cellulaires révertants et ayant une forte implication dans le processus de la réversion, pour essayer de répondre tout au moins en partie à cette question (Fiucci et al., 2004) (Passer et al., 2003) (Fiucci et al., 2003) (Susini et al., 2008). Une approche pharmacologique a également été élaborée dans le but de mettre au point de nouvelles drogues anti-cancéreuses basées sur les découvertes faites dans le mécanisme de la réversion (Tuynder et al., 2004).

Le gène *tsap6* a été identifié comme surexprimé dans les cellules LTR6 cultivées à 32°C pour activer la protéine P53 et dans les cellules révertantes KS et US comparé aux cellules parentales tumorales K562 et U937 (Amson et al., 1996). Certaines cibles directes de la protéine P53 comme la protéine P21 ont un site consensus de liaison pour P53 dans leur région promotrice, mais peuvent également être activées de manière indépendante comme c'est le cas pour P21 (Parker et al., 1995) (Michieli et al., 1994). Typiquement, dans les clones révertants US, il y a une forte expression de P21 alors que, dans ces clones révertants, la protéine P53 est mutée et non fonctionnelle.

Nous montrons dans un premier article que TSAP6 contient dans sa région promotrice un site consensus pour la protéine P53 (**Fig. 10**) (Passer et al., 2003) (**Annexe 3**). Au cours de cette étude, nous révélons aussi que suite à l'activation de la protéine P53, l'expression de TSAP6 est induite et que les cellules se bloquent en G2. L'activation de TSAP6 par la protéine P53 induit également une mort cellulaire par apoptose. Nous montrons que ces deux actions se font par l'intermédiaire de l'interaction de TSAP6 avec MYT1 un régulateur négatif de la transition G2->M et NIX une protéine pro-apoptotique de la famille des BCL-2. Notre équipe a également prouvé que TSAP6 se lie à la protéine TCTP et que la surexpression de TSAP6 induit la sécrétion de TCTP en partie par l'intermédiaire des exosomes (Amzallag et al., 2004).

Nous montrons ici que les souris knockout pour le gène *tsap6* présente une anémie microcytaire hypochromique et nous démontrons que ce phénotype s'explique par un défaut dans la maturation des réticulocytes dû à une mauvaise élimination du TF-R par les exosomes et une fragilité des globules rouges soumis à une pression hyper-osmotique. L'importance de l'élimination du récepteur à la TF-R dans la maturation des érythrocytes pourrait justifier pourquoi nous n'avons qu'un phénotype majeur dans les globules rouges (Zhang et al., 2006). Ces animaux nous ont permis également de souligner l'importance de TSAP6 dans la signalisation de l'apoptose suite à l'activation de P53. Ces animaux déficients en TSAP6 répondent beaucoup moins à la stimulation de P53 : absence du blocage des cellules en G2 et moins de cellules apoptotiques suites à des cassures double-brin par irradiations. Nous montrons finalement que la suppression du gène TSAP6 dans ces animaux a en plus un effet sur une voie de sécrétion non-classique. Les animaux TSAP6 KO ne montrent pas

d'augmentation de la sécrétion des exosomes suite à la stimulation de P53 comparés aux animaux WT. Nous montrons ici que TSAP6 est la première protéine connue qui régule la sécrétion des exosomes suite à l'activation de P53. La protéine TSAP6 est donc au centre d'une réponse complexe suite à la stimulation de P53.

L'explication donnée au phénotype de ces souris est différente de celle avancée par le groupe de Fleming en 2005. Mais ces derniers n'avaient pas du tout regardé la voie des exosomes (Oghami et al., 2005) (Oghami et al., 2006). Nous montrons ici qu'il ne s'agit pas seulement d'un problème de ferric-réductase. Le fer est indispensable à la synthèse d'hémoglobine et celui-ci est absorbé dans les globules rouges par endocytose du TF-R (Gunshin et al., 2005). Dans notre étude, l'anémie serait plutôt dûe à un défaut de la synthèse d'hémoglobine suite à un mauvais captage du fer par le réticulocyte. On ne sait pas au juste si l'endocytose du TF-R est compromise dans ces animaux mais vu la localisation cellulaire de TSAP6 à la membrane plasmique et dans les endosomes, il se pourrait que l'invagination du TF-R dans la cellule soit perturbée. Des résultats préliminaires montrent que la protéine TSAP6 est localisée à la membrane plasmique des réticulocytes et au niveau des endosomes et elle pourrait peut-être participer avec d'autres protéines à la formation des vésicules et/ou à la sortie du TF-R par les exosomes. La protéine TSAP6 est également localisée au niveau du TGN et il serait intéressant de regarder si le trafic cellulaire en plus des exosomes, est touché par la délétion du gène *tsap6* en regardant également les autres voies de sécrétion non-classique.

Dans ces animaux, nous révélons que la réponse à la stimulation de P53 est déficitaire suite à la perte de TSAP6. Il serait intéressant de voir si ces animaux développent préférentiellement des tumeurs au cours du temps. Nous avons expliqué précédemment que TSAP6 régule la sécrétion de TCTP en partie par l'intermédiaire des exosomes. Ceci est tout à fait en harmonie avec nos derniers résultats. TCTP est une protéine anti-apoptotique et il semble tout à fait légitime, que dans nos cellules si perfectionnées, l'induction de P53 provoque un blocage du cycle cellulaire en G1 ou G2, une réparation de l'ADN, l'apoptose mais qu'en plus elle puisse induire la sécrétion de protéines qui peuvent gêner son action comme la protéine TCTP par l'intermédiaire de la sécrétion par les exosomes (Aylon et al., 2007). Les exosomes sont communs à toutes les cellules contenant des structures multi-vésiculaires. De nombreuses études montrent qu'ils sont responsables de la sécrétion de protéines obsolètes comme le TF-R dans les réticulocytes mais qu'ils sont aussi au cœur de la réponse immunitaire (Johnstone et al., 1987). Ils sont à la fois immuno-stimulateurs ou immuno-supresseurs (Segura et al., 2005 (Peché et al., 2006). Ils peuvent induire une réponse anti-tumorale en inhibant la croissance d'une tumeur dans une souris (Zitvogel et al., 1998). Les effusions de patients atteints de cancer contiennent une quantité abondante de vésicules ayant les caractéristiques des exosomes (André et al., 2002). Toutes ces données montrent que les exosomes sont à la base d'une communication intercellulaire, mais que leur fonction semble dépendre du type cellulaire d'origine mais également de l'état dans lequel la cellule se trouve. Nos résultats laissent apparaître une relation entre la sécrétion d'exosomes et la transmission du signal apoptotique, ce qui suggèrent que ces vésicules pourraient être à la base de la réponse par « bystander » qui consiste en l'envoi d'un signal d'une cellule irradiée vers une cellule non irradiée permettant d'observer un effet biologique dans les cellules non exposées. Plusieurs études cliniques sont en cours pour tester la potentialité d'utiliser les exosomes dans des mécanismes d'immunothérapie pour traiter les cancers. La maîtrise de la régulation de la protéine TSAP6 pourrait être complémentaire dans ces études.

TCTP est une protéine anti-apoptotique inhibée dans les modèles révertants et dans les cellules LTR6 dans lesquelles P53 est activée (Tuynder et al., 2002). Pour générer des souris knockout pour le gène *tctp* et étudier la fonction de TCTP *in vivo*, il a d'abord fallu identifier le gène fonctionnel parmi plusieurs pseudogènes présents dans le génome de la souris. Ce fut l'objet d'une publication dans laquelle nous montrons la présence de nombreux pseudogènes localisés entre autres sur les chromosomes 6, 9 et 14. Nous montrons par Northern-Blot, PCR semi-quantitative et par des essais de gène rapporteur luciférase, que le gène *tpt1* localisé sur le chromosome 14 est fonctionnel, qu'il possède un promoteur actif et que seulement un transcrit est exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus (Fiucci et al., 2003) ([Annexe 4](#)).

Le phénotype principal des souris knockout pour le gène *tpt1* est une mort des embryons au cours du développement entre le 6,5^{ème} et le 9,5^{ème} jour post-coit (Susini et al., 2008). L'analyse structurale de TCTP par cristallographie met en évidence une homologie de conformation entre les hélices H2 et H3 de TCTP et les hélices H5 et H6 de BAX. Nous montrons dans cet article que la fonction anti-apoptotique de TCTP se fait par l'intermédiaire de ces deux hélices et que celles-ci bloquent l'activité pro-apoptotique de BAX en inhibant sa dimérisation au niveau des mitochondries sans pour autant interagir ensemble de manière directe comme l'ont déjà montré d'autres auteurs (Liu et al., 2005) (Zhang et al., 2002). Les mêmes expériences avec la protéine TCTP mutée au niveau des hélices en K102 et E109 ont permis de montrer que ces mutations n'inhibent pas la liaison de TCTP à la mitochondrie mais empêchent la dimérisation de BAX. Ce qui laisse envisager que ce ne sont pas les hélices qui sont à l'origine de la liaison de TCTP aux mitochondries. Par contre, TCTP se lie à deux autres protéines anti-apoptotiques MCL-1 et BCL-XL par sa partie N-terminale (Yang et al., 2005). Toutes les protéines de la famille des BCL-2 fonctionnent en homodimère ou en hétérodimère, mais TCTP n'appartient pas à cette famille de protéine (Borner et al., 2003). Suite à l'activation par t-BID, BAX, localisée à la membrane externe des mitochondries, changerait de conformation afin de s'ancrer à la membrane et permettre l'ouverture des pores PTP (Permeability Transition Pore) pour faciliter la libération de facteurs apoptogènes et le CYT-C. Les protéines anti-apoptotiques MCL-1 et BCL-xL, normalement localisées à la membrane externe des mitochondries ont pour rôle d'inhiber entre autres la fonction de BAX et d'empêcher l'ouverture des pores PTP. TCTP protégerait la protéine MCL-1 de la voie de dégradation par le protéasome suite à son ubiquitination.

TCTP est un gène anti-apoptotique qui participe à la régulation de l'apoptose en collaboration avec des protéines de la famille BCL-2 comme les protéines anti-apoptotiques MCL-1 et BCL-xL ou la protéine pro-apoptotique BAX. Mais TCTP n'appartient pas à la famille des BCL-2, la protéine ne contient pas de domaine BH comme toutes les autres protéines de cette famille, on a juste mis en évidence que les deux hélices H2 et H3 avaient une homologie avec le pore forming domain de la protéine BAX. Jusqu'à présent on pensait que la fonction anti-apoptotique de TCTP passait par la stabilisation des membres anti-apoptotiques BCL-xL et MCL-1 mais nos résultats montrent également que TCTP inhibe l'action pro-apoptotique de BAX.

Il serait intéressant de comprendre le rôle de chaque partenaire dans la structure de ce multi-complexe. Est ce que naturellement ce complexe existe dans la cellule ou est ce plutôt une réaction en cascade? Les études nécessitant des modèles *in vivo* pour TCTP ne pourront se faire qu'avec des cKO.

Dans le but de développer de nouvelles drogues plus spécifiques et moins destructrices dans le traitement du cancer, notre équipe a cherché à identifier des médicaments ayant pour cible TCTP. Pourquoi avoir choisi TCTP pour cible ? La première chose qui a conforté Adam Telerman et Robert Amson à choisir TCTP comme nouvelle cible thérapeutique est que cette protéine soit hyper-exprimée dans les tissus cancéreux comparé aux tissus sains (Tuynder et al., 2004). La seconde caractéristique qui fait de TCTP une cible intéressante est que dans des cellules tumorales comme T47D ou MCF-7, la réduction de l'expression de TCTP par l'utilisation d'antisense induit une suppression du phénotype malin de ces cellules. L'inhibition de TCTP, par l'utilisation d'antisense, est également capable d'induire la réversion tumorale dans des cellules NIH-3T3 transformées par l'oncogène v-src.

TCTP aussi appelé HRF par le groupe de MacDonald est capable d'induire la sécrétion d'Histamine par les basophiles (MacDonald et al., 1995). Le point de départ de l'approche pharmacologique a été de tester les anti-histaminiques sur des cellules cancéreuses. Plusieurs anti-histaminiques ont été testés, puis par homologie de structure, plusieurs drogues dont la Sertraline et la Thioridazine. Ces drogues ont un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses U937. De plus, elles inhibent le développement des tumeurs dans les souris *scid/scid* et induisent la baisse de TCTP (Tuynder et al., 2004) (*Annexe 5*).

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme d'action de ces deux drogues. Les résultats préliminaires montrent qu'elles augmentent le niveau de TSAP6 dans les cellules, qu'elles se lient à TCTP et inhibent l'interaction TSAP6-TCTP et enfin qu'elles induisent sa sécrétion par une voie de sécrétion différentes de la voie des exosomes. L'hypothèse serait que ces drogues forcent la protéine anti-apoptotique TCTP à emprunter une autre voie de sécrétion que celle des exosomes alors qu'elles séquestrent à l'intérieur de la cellule la protéine pro-apoptotique TSAP6. Ceci n'est pas incompatible avec la localisation de TSAP6 au niveau du TGN. Il existe d'autres voies de sécrétion non-classique qui sont insensibles aux inhibiteurs du RE comme la sécrétion par translocation et l'exocytose, et l'un des objectifs serait d'identifier cette voie de sécrétion (Nickel et al., 2003).

Les drogues Sertraline et Thioridazine inhibent la formation du complexe TSAP6-TCTP. Les études que l'on a faites jusqu'à présent ne nous permettent pas de savoir s'il y a un changement de conformation lors de la liaison de la drogue sur TCTP qui pourrait empêcher la formation du complexe TSAP6-TCTP ou s'il s'agit d'une compétition entre les drogues et TSAP6 pour un même site de liaison sur la protéine TCTP. Il serait intéressant d'identifier le site de liaison de ces drogues sur la protéine TCTP afin de comprendre l'interaction entre les deux molécules. Cette information pourrait aussi nous permettre par la suite de modifier la structure des drogues pour améliorer l'affinité entre les drogues et la protéine TCTP et augmenter leurs efficacités.

Cela fait maintenant 40 ans que le concept de la réversion tumorale existe depuis les observations de Pollack. Depuis l'apparition de ce concept, quelques travaux seulement ont été publiés entre la fin des années 1960 et le début des années 80, alors que les études sur la cancérisation se développent et les mécanismes se clarifient. Au cours de la cancérisation, deux types de gènes sont modulés dans leurs expressions : les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes. Des expériences de complémentation par ADN montrent que la restauration de l'expression de ces gènes à un niveau normal va permettre de supprimer ou tout du moins d'atténuer le phénotype tumoral de ces cellules cancéreuses. Dans le cas de la réversion

tumorale, nos études montrent que la plupart des gènes qui sont impliqués dans ce processus n'appartiennent pas à la famille des oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs (Tuynder et al., 2002). Tous les processus vitaux sont modulés lors de ce processus, mais au jour d'aujourd'hui rien ne nous permet de conclure sur le mécanisme déclencheur de ce processus. La réversion est-elle déclenché par des facteurs génétiques ou épigénétiques ?

L'approche pharmacologique entreprise n'a eu que pour but de mimer en partie ce que l'analyse différentielle de l'expression des gènes entre les clones révertants et les cellules tumorales avait pue nous révéler. En effet, essayer de baisser le niveau de TCTP dans des cellules cancéreuses afin de provoquer la réversion de ces cellules n'avait que pour ambition de démontrer *in vivo* ce que nous savions de cette analyse différentielle. Ce fut une grande surprise de découvrir qu'en plus d'une baisse du niveau de TCTP, ces cellules induisaient également l'augmentation du niveau de TSAP6. Ces dernières données nous interrogent sur un autre point, la baisse de TCTP et l'augmentation de TSAP6 dans les cellules révertantes, est ce que ce sont deux faits complètement indépendants mais complémentaires ou est ce que la baisse de TCTP découle de l'augmentation de TSAP6 ou inversement.

En conclusion, ce travail de thèse m'a permis d'étudier deux protéines TSAP6 et TCTP en faisant appel à des technologies comme la cristallographie (pour TCTP) ou encore la génération de souris knockout. Ce sont probablement les approches les plus recommandées pour étudier la fonction des protéines *in vivo*.

Le cristal de TCTP (J. Cavarelli – D. Moras, Strasbourg) nous a fait « entrevoir » que ses hélices H2-H3 pouvaient jouer un rôle important dans la protection contre l'apoptose. Les souris TCTP knockout (J-C Marine, Gand) démontrent qu'en l'absence de ce gène, il y a mort à l'état embryonnaire et augmentation de l'apoptose. Ces expériences, menées conjointement avec les expériences fonctionnelles (J-C Martinou, Genève), nous ont permis d'avoir une base mécanistique à la fonction de TCTP de par son ancrage dans les membranes mitochondriales.

Les souris TSAP6 knockout ont clarifié la fonction de ce gène *in vivo* durant la maturation de la lignée rouge et son rôle dans la sécrétion des exosomes.

Enfin, l'approche sur les drogues potentielles nous a montrés que la Sertraline et la Thioridazine se liaient directement à TCTP et surtout, que ces drogues arrivaient à rompre l'interaction TSAP6-TCTP.

Il est tout à fait évident que les gènes que nous avons étudiés font partie du programme cellulaire de la réversion tumorale, ce qui ne les empêche pas de croiser la voie de p53. Il est fort probable que les voies de la transformation tumorale (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) croisent à certains niveaux celles de la réversion tumorale. Les mécanismes génétiques et moléculaires qui sont à la base du processus de réversion nous projettent dans l'avenir.

Références bibliographiques

Articles

Alcaraz, A., Takahashi, S., Brown, J. A., Herath, J. F., Bergstralh, E. J., Larson-Keller, J. J., Lieber, M. M., & Jenkins, R. B. (1994). Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res*, 54(15), 3998-4002.

Alves, P. M., Faure, O., Graff-Dubois, S., Cornet, S., Bolonakis, I., Gross, D. A., Miconnet, I., Chouaib, S., Fizazi, K., Soria, J. C., Lemonnier, F. A., & Kosmatopoulos, K. (2006). STEAP, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 55(12), 1515-1523.

Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J. P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., Piouffre, L., Prieur, S., Susini, L., Alvaro, V., Millasseau, P., Guidicelli, C., Bui, H., Massart, C., Cazes, L., Dufour, F., Bruzzoni-Giovanelli, H., Owadi, H., Hennion, C., Charpak, G., Telerman, A., & 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), 3953-3957.

Amzallag, N., Passer, B. J., Allanic, D., Segura, E., They, C., Goud, B., Amson, R., & Telerman, A. (2004). TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem*, 279(44), 46104-46112.

Andre, F., Chaput, N., Scharz, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D. H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2004). Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol*, 172(4), 2126-2136.

Andre, F., Scharz, N. E., Chaput, N., Flament, C., Raposo, G., Amigorena, S., Angevin, E., & Zitvogel, L. (2002). Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*, 20 Suppl 4, A28-31.

Andree, H., Thiele, H., Fahling, M., Schmidt, I., & Thiele, B. J. (2006). Expression of the human TPT1 gene coding for translationally controlled tumor protein (TCTP) is regulated by CREB transcription factors. *Gene*, 380(2), 95-103.

Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 341(26), 1986-1995.

Arcuri, F., Papa, S., Carducci, A., Romagnoli, R., Liberatori, S., Riparbelli, M. G., Sanchez, J. C., Tosi, P., & del Vecchio, M. T. (2004). Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate*, 60(2), 130-140.

- Arcuri, F., Papa, S., Meini, A., Carducci, A., Romagnoli, R., Bianchi, L., Riparbelli, M. G., Sanchez, J. C., Palmi, M., Tosi, P., & Cintonino, M. (2005). The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells. *Biol Reprod*, 73(4), 745-751.
- Aylon, Y., & Oren, M. (2007). Living with p53, dying of p53. *Cell*, 130(4), 597-600.
- Bangrak, P., Graidist, P., Chotigeat, W., & Phongdara, A. (2004). Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. *J Biotechnol*, 108(3), 219-226.
- Bard, M. P., Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luider, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L. A., van Meerbeeck, J. P., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C., & Lambrecht, B. N. (2004). Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31(1), 114-121.
- Barlow, C., Hirotsume, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., & Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, 86(1), 159-171.
- Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., Stone, M., & et al. (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 306(5940), 277-280.
- Bassik, M. C., Scorrano, L., Oakes, S. A., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *Embo J*, 23(5), 1207-1216.
- Baudet, C., Perret, E., Delpech, B., Kaghad, M., Brachet, P., Wion, D., & Caput, D. (1998). Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death program. *Cell Death Differ*, 5(1), 116-125.
- Baxter, N. J., Thaw, P., Higgins, L. D., Sedelnikova, S. E., Bramley, A. L., Price, C., Waltho, J. P., & Craven, C. J. (2000). Backbone NMR assignment of the 19 kDa translationally controlled tumor-associated protein p23fyp from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biomol NMR*, 16(1), 83-84.
- Benndorf, R., Nurnberg, P., & Bielka, H. (1988). Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis. *Exp Cell Res*, 174(1), 130-138.
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*, 14(2), 159-169.
- Bhisutthibhan, J., & Meshnick, S. R. (2001). Immunoprecipitation of [(3)H]dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(8), 2397-2399.

- Bhisutthibhan, J., Pan, X. Q., Hossler, P. A., Walker, D. J., Yowell, C. A., Carlton, J., Dame, J. B., & Meshnick, S. R. (1998). The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J Biol Chem*, 273(26), 16192-16198.
- Bhisutthibhan, J., Philbert, M. A., Fujioka, H., Aikawa, M., & Meshnick, S. R. (1999). The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur J Cell Biol*, 78(9), 665-670.
- Biberstine-Kinkade, K. J., DeLeo, F. R., Epstein, R. I., LeRoy, B. A., Nauseef, W. M., & Dinauer, M. C. (2001). Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem*, 276(33), 31105-31112.
- Bini, L., Heid, H., Liberatori, S., Geier, G., Pallini, V., & Zwillig, R. (1997). Two-dimensional gel electrophoresis of Caenorhabditis elegans homogenates and identification of protein spots by microsequencing. *Electrophoresis*, 18(3-4), 557-562.
- Blanc, L., De Gassart, A., Geminard, C., Bette-Bobillo, P., & Vidal, M. (2005). Exosome release by reticulocytes--an integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis*, 35(1), 21-26.
- Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633-1649.
- Bohm, H., Benndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nurnberg, P., Kraft, R., Otto, A., & Bielka, H. (1989). The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int*, 19(2), 277-286.
- Bohm, H., Gross, B., Gaestel, M., Bommer, U. A., Ryffel, G., & Bielka, H. (1991). The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed Biochim Acta*, 50(12), 1193-1203.
- Bommer, U. A., Borovjagin, A. V., Greagg, M. A., Jeffrey, I. W., Russell, P., Laing, K. G., Lee, M., & Clemens, M. J. (2002). The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *Rna*, 8(4), 478-496.
- Bommer, U. A., Lazaris-Karatzas, A., De Benedetti, A., Nurnberg, P., Benndorf, R., Bielka, H., & Sonenberg, N. (1994). Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23: involvement of eIF-4E. *Cell Mol Biol Res*, 40(7-8), 633-641.
- Bommer, U. A., & Thiele, B. J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol*, 36(3), 379-385.
- Bonnet, C., Perret, E., Dumont, X., Picard, A., Caput, D., & Lenaers, G. (2000). Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast*, 16(1), 23-33.

- Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*, 39(11), 615-647.
- Boutros, R., Dozier, C., & Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, 18(2), 185-191.
- Brar, S. S., Corbin, Z., Kennedy, T. P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarium, B., Arnold, R. S., Whorton, A. R., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Quinn, M. T., Krenitsky, K., Ardie, K. G., Lambeth, J. D., & Hoidal, J. R. (2003). NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(2), C353-369.
- Bras, M., Queenan, B., & Susin, S. A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*, 70(2), 231-239.
- Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D. H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S. R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R. B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J., & Corcoran, K. (2000). Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol*, 18(6), 630-634.
- Brenner, S., Williams, S. R., Vermaas, E. H., Storck, T., Moon, K., McCollum, C., Mao, J. I., Luo, S., Kirchner, J. J., Eletr, S., DuBridge, R. B., Burcham, T., & Albrecht, G. (2000). In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1665-1670.
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell*, 21(3), 307-315.
- Caby, M. P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17(7), 879-887.
- Cans, C., Passer, B. J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., Fiucci, G., Goud, B., Mirande, M., Amson, R., & Telerman, A. (2003). Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 13892-13897.
- Carthew, R. W., & Rubin, G. M. (1990). *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell*, 63(3), 561-577.
- Castillo-Davis, C. I., Kondrashov, F. A., Hartl, D. L., & Kulathinal, R. J. (2004). The functional genomic distribution of protein divergence in two animal phyla: coevolution, genomic conflict, and constraint. *Genome Res*, 14(5), 802-811.
- Chambaut-Guerin, A. M., & Pairault, J. (2005). Tumour necrosis factor alpha-induced adipose-related protein (TIARP): co-localization with caveolin-1. *Biol Cell*, 97(5), 339-347.

- Chaput, N., Flament, C., Viaud, S., Taieb, J., Roux, S., Spatz, A., Andre, F., LePecq, J. B., Boussac, M., Garin, J., Amigorena, S., Thery, C., & Zitvogel, L. (2006). Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol*, 80(3), 471-478.
- Chen, H. H., Zhou, H. J., & Fang, X. (2003). Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacol Res*, 48(3), 231-236.
- Chen, J., Willingham, T., Shuford, M., & Nisen, P. D. (1996). Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1. *J Clin Invest*, 97(8), 1983-1988.
- Chen, S. H., Wu, P. S., Chou, C. H., Yan, Y. T., Liu, H., Weng, S. Y., & Yang-Yen, H. F. (2007). A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell*, 18(7), 2525-2532.
- Chitpatima, S. T., & Brawerman, G. (1988). Shifts in configuration of the 5'-noncoding region of a mouse messenger RNA under translational control. *J Biol Chem*, 263(15), 7164-7169.
- Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R., & Brawerman, G. (1988). Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 16(5), 2350.
- Chung, S., Kim, M., Choi, W., Chung, J., & Lee, K. (2000). Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett*, 156(2), 185-190.
- Coulouarn, C., Derambure, C., Lefebvre, G., Daveau, R., Hiron, M., Scotte, M., Francois, A., Daveau, M., & Salier, J. P. (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), 860-869.
- Craven, C. M., Alexander, J., Eldridge, M., Kushner, J. P., Bernstein, S., & Kaplan, J. (1987). Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(10), 3457-3461.
- Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., & Klausner, R. D. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3869-3873.
- Dandekar, D. S., & Lokeshwar, B. L. (2004). Inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 expression by Tet-inducible COX-2 antisense cDNA in hormone-refractory prostate cancer significantly slows tumor growth and improves efficacy of chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res*, 10(23), 8037-8047.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., & Kroemer, G. (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J*, 14(5), 729-739.

- de Fatima Bonaldo, M., Jelenc, P., Su, L., Lawton, L., Yu, M. T., Warburton, D., & Soares, M. B. (1996). Identification and characterization of three genes and two pseudogenes on chromosome 13. *Hum Genet*, 97(4), 441-452.
- de Souza-Pinto, N. C., Harris, C. C., & Bohr, V. A. (2004). p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. *Oncogene*, 23(39), 6559-6568.
- DeVane, C. L., Liston, H. L., & Markowitz, J. S. (2002). Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clin Pharmacokinet*, 41(15), 1247-1266.
- Dhanasekaran, S. M., Dash, A., Yu, J., Maine, I. P., Laxman, B., Tomlins, S. A., Creighton, C. J., Menon, A., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2005). Molecular profiling of human prostate tissues: insights into gene expression patterns of prostate development during puberty. *Faseb J*, 19(2), 243-245.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., & Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366), 215-221.
- Donovan, A., Roy, C. N., & Andrews, N. C. (2006). The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology (Bethesda)*, 21, 115-123.
- Drew, D., Sjostrand, D., Nilsson, J., Urbig, T., Chin, C. N., de Gier, J. W., & von Heijne, G. (2002). Rapid topology mapping of Escherichia coli inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 2690-2695.
- Dunn, L. L., Rahmanto, Y. S., & Richardson, D. R. (2007). Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*, 17(2), 93-100.
- Dworniczak, B., Skryabin, B., Tchinda, J., Heuck, S., Seesing, F. J., Metzger, D., Chambon, P., Horst, J., & Pennekamp, P. (2007). Inducible Cre/loxP recombination in the mouse proximal tubule. *Nephron Exp Nephrol*, 106(1), e11-20.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., Van Goethem, I. D., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., & Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*, 424(6951), 957-961.
- Edwards, S., Campbell, C., Flohr, P., Shipley, J., Giddings, I., Te-Poele, R., Dodson, A., Foster, C., Clark, J., Jhavar, S., Kovacs, G., & Cooper, C. S. (2005). Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer. *Br J Cancer*, 92(2), 376-381.
- Esteller, M. (2006). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer*, 94(2), 179-183.
- Ezeamuzie, I. C., & Assem, E. S. (1983). A study of histamine release from human basophils and lung mast cells by products of lymphocyte stimulation. *Agents Actions*, 13(2-3), 222-230.

- Fasshauer, M., Klein, J., Kralisch, S., Lossner, U., Klier, M., Bluher, M., & Paschke, R. (2003). GH is a positive regulator of tumor necrosis factor alpha-induced adipose related protein in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol*, 178(3), 523-531.
- Fasshauer, M., Kralisch, S., Klier, M., Lossner, U., Bluher, M., Chambaut-Guerin, A. M., Klein, J., & Paschke, R. (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), 153-157.
- Faure, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., & Sadoul, R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*, 31(4), 642-648.
- Fei, P., Wang, W., Kim, S. H., Wang, S., Burns, T. F., Sax, J. K., Buzzai, M., Dicker, D. T., McKenna, W. G., Bernhard, E. J., & El-Deiry, W. S. (2004). Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 6(6), 597-609.
- Feng, Y., Liu, D., Yao, H., & Wang, J. (2007). Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Arch Biochem Biophys*.
- Ferguson, D. A., Muenster, M. R., Zang, Q., Spencer, J. A., Schageman, J. J., Lian, Y., Garner, H. R., Gaynor, R. B., Huff, J. W., Pertsemelidis, A., Ashfaq, R., Schorge, J., Becerra, C., Williams, N. S., & Graff, J. M. (2005). Selective identification of secreted and transmembrane breast cancer markers using *Escherichia coli* ampicillin secretion trap. *Cancer Res*, 65(18), 8209-8217.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 18(3), 581-592.
- Fevrier, B., Vilette, D., Laude, H., & Raposo, G. (2005). Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic*, 6(1), 10-17.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., & Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083-1093.
- Fiucci, G., Beaucourt, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Stumptner-Cuvelette, P., Geant, A., Buchwalter, G., Tuynder, M., Susini, L., Lassalle, J. M., Wasylyk, C., Wasylyk, B., Oren, M., Amson, R., & Telerman, A. (2004). 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*, 101(10), 3510-3515.
- Fiucci, G., Lespagnol, A., Stumptner-Cuvelette, P., Beaucourt, S., Duflaut, D., Susini, L., Amson, R., & Telerman, A. (2003). Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene. *Genomics*, 81(6), 570-578.
- Fleming, M. D., Trenor, C. C., 3rd, Su, M. A., Foernzler, D., Beier, D. R., Dietrich, W. F., & Andrews, N. C. (1997). Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 16(4), 383-386.

- Gachet, Y., Lee, M., Sawitzki, B., Tournier, S., Poulton, T., & Bommer, U. A. (1997). Intracellular colocalisation of the translationally controlled protein P23 with cytoskeletal structures. *Biochem Soc Trans*, 25(2), 269S.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., & Bommer, U. A. (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci*, 112 (Pt 8), 1257-1271.
- Galaktionov, K., Jesus, C., & Beach, D. (1995). Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev*, 9(9), 1046-1058.
- Garcia-Hernandez Mde, L., Gray, A., Hubby, B., & Kast, W. M. (2007). In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer. *Cancer Res*, 67(3), 1344-1351.
- Garrigos, M., Deschamps, S., Viel, A., Lund, S., Champeil, P., Moller, J. V., & le Maire, M. (1991). Detection of Ca(2+)-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca²⁺ combined with ⁴⁵Ca²⁺ overlay of protein blots. *Anal Biochem*, 194(1), 82-88.
- Gatz, S. A., & Wiesmuller, L. (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ*, 13(6), 1003-1016.
- Geiszt, M., & Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem*, 279(50), 51715-51718.
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227.
- Gil-Ad, I., Shtaf, B., Levkovitz, Y., Nordenberg, J., Taler, M., Korov, I., & Weizman, A. (2006). Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncol Rep*, 15(1), 107-112.
- Gnanasekar, M., Rao, K. V., Chen, L., Narayanan, R. B., Geetha, M., Scott, A. L., Ramaswamy, K., & Kaliraj, P. (2002). Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol*, 121(1), 107-118.
- Graidist, P., Phongdara, A., & Fujise, K. (2004). Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J Biol Chem*, 279(39), 40868-40875.
- Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C. C., Chang, J. Y., Phongdara, A., & Fujise, K. (2007). Fortilin binds calcium and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo. *Biochem J*.
- Greenman, C. et al., (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153-158.

- Groden, J., Joslyn, G., Samowitz, W., Jones, D., Bhattacharyya, N., Spirio, L., Thliveris, A., Robertson, M., Egan, S., Meuth, M., & et al. (1995). Response of colon cancer cell lines to the introduction of APC, a colon-specific tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 55(7), 1531-1539.
- Gross, B., Gaestel, M., Bohm, H., & Bielka, H. (1989). cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucleic Acids Res*, 17(20), 8367.
- Guillaume, E., Pineau, C., Evrard, B., Dupaix, A., Moertz, E., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., & Jegou, B. (2001). Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. *Proteomics*, 1(7), 880-889.
- Gunshin, H., Starr, C. N., Drenzo, C., Fleming, M. D., Jin, J., Greer, E. L., Sellers, V. M., Galica, S. M., & Andrews, N. C. (2005). Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*, 106(8), 2879-2883.
- Guthrie, S. K. (1991). Sertraline: a new specific serotonin reuptake blocker. *Dicp*, 25(9), 952-961.
- Haghighat, N. G., & Ruben, L. (1992). Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 51(1), 99-110.
- Hall, M., & Peters, G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res*, 68, 67-108.
- Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P., & Tachibana, T. (1969). Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 223(5204), 363-368.
- Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899-2908.
- Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94(11), 3791-3799.
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 397-422.
- Hengartner, M. O., & Horvitz, H. R. (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell*, 76(4), 665-676.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., & Andrews, N. C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, 117(3), 285-297.
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., & Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem*, 277(5), 3247-3257.

- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.
- Hsu, Y. C., Chern, J. J., Cai, Y., Liu, M., & Choi, K. W. (2007). *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature*, 445(7129), 785-788.
- Huang, D. C., O'Reilly, L. A., Strasser, A., & Cory, S. (1997). The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *Embo J*, 16(15), 4628-4638.
- Hubert, R. S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S. C., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, A. B., Jakobovits, A., Saffran, D. C., & Afar, D. E. (1999). STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(25), 14523-14528.
- Hwang, H. W., & Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*, 94(6), 776-780.
- Johnson, T. M., Antrobus, R., & Johnson, L. N. (2008). Plk1 Activation by Ste20-like Kinase (Slk) Phosphorylation and Polo-Box Phosphopeptide Binding Assayed with the Substrate Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP). *Biochemistry*.
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262(19), 9412-9420.
- Jung, J., Kim, M., Kim, M. J., Kim, J., Moon, J., Lim, J. S., Kim, M., & Lee, K. (2004). Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. *J Biol Chem*, 279(48), 49868-49875.
- Kamath, R. S., & Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30(4), 313-321.
- Kang, H. S., Lee, M. J., Song, H., Han, S. H., Kim, Y. M., Im, J. Y., & Choi, I. (2001). Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. *J Immunol*, 166(11), 6545-6554.
- Keller, P., & Simons, K. (1997). Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci*, 110 (Pt 24), 3001-3009.
- Khosravi-Far, R., & Esposti, M. D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*, 3(11), 1051-1057.
- Kim, M., Jung, Y., Lee, K., & Kim, C. (2000). Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch Pharm Res*, 23(6), 633-636.

- Kim, M. J., Bahk, Y. Y., Min, D. S., Lee, S. J., Ryu, S. H., & Suh, P. G. (1993). Cloning of cDNA encoding rat phospholipase C-beta 4, a new member of the phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun*, 194(2), 706-712.
- Kim, M. J., Kwon, J. S., Suh, S. H., Suh, J. K., Jung, J., Lee, S. N., Kim, Y. H., Cho, M. C., Oh, G. T., & Lee, K. (2008). Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Mol Cell Cardiol*, 44(1), 151-159.
- Kim, S. H., Cairns, N., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2001). Decreased brain histamine-releasing factor protein in patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 300(1), 41-44.
- Klausner, R. D., & Dancis, A. (1994). A genetic approach to elucidating eukaryotic iron metabolism. *FEBS Lett*, 355(2), 109-113.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4), 820-823.
- Kobayashi, H., Nagato, T., Sato, K., Aoki, N., Kimura, S., Murakami, M., Iizuka, H., Azumi, M., Kakizaki, H., Tateno, M., & Celis, E. (2007). Recognition of prostate and melanoma tumor cells by six-transmembrane epithelial antigen of prostate-specific helper T lymphocytes in a human leukocyte antigen class II-restricted manner. *Cancer Res*, 67(11), 5498-5504.
- Korkmaz, C. G., Korkmaz, K. S., Kurys, P., Elbi, C., Wang, L., Klock, T. I., Hammarstrom, C., Troen, G., Svindland, A., Hager, G. L., & Saatcioglu, F. (2005). Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*, 24(31), 4934-4945.
- Korkmaz, K. S., Elbi, C., Korkmaz, C. G., Loda, M., Hager, G. L., & Saatcioglu, F. (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), 36689-36696.
- Korkmaz, K. S., Korkmaz, C. G., Ragnhildstveit, E., Pretlow, T. G., & Saatcioglu, F. (2000). An efficient procedure for cloning hormone-responsive genes from a specific tissue. *DNA Cell Biol*, 19(8), 499-506.
- Kruys, V., Wathelet, M., Poupart, P., Contreras, R., Fiers, W., Content, J., & Huez, G. (1987). The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(17), 6030-6034.
- Lambeth, J. D. (2002). Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol*, 9(1), 11-17.
- Lander, E. S. et al., (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15-16.

- Langdon, J. M., Vonakis, B. M., & MacDonald, S. M. (2004). Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). *Biochim Biophys Acta*, 1688(3), 232-236.
- Lee, H., & Paik, S. G. (2006). Regulation of BNIP3 in normal and cancer cells. *Mol Cells*, 21(1), 1-6.
- Lee, J. M., Kusakabe, T., Kawaguchi, Y., Miyagawa, Y., Takahashi, M., Mon, H., Nho, S. K., & Koga, K. (2004). Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein gene in *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 139(1), 35-43.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Levine, A. J., Hu, W., & Feng, Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*, 13(6), 1027-1036.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20.
- Li, F., Zhang, D., & Fujise, K. (2001). Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem*, 276(50), 47542-47549.
- Li, L., & Ross, A. H. (2007). Why is PTEN an important tumor suppressor? *J Cell Biochem*, 102(6), 1368-1374.
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95-99.
- Lim, J. E., Jin, O., Bennett, C., Morgan, K., Wang, F., Trenor, C. C., 3rd, Fleming, M. D., & Andrews, N. C. (2005). A mutation in *Sec1511* causes anemia in hemoglobin deficit (*hbd*) mice. *Nat Genet*, 37(11), 1270-1273.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H., & Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 557-589.
- Liu, H., Peng, H. W., Cheng, Y. S., Yuan, H. S., & Yang-Yen, H. F. (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of *mcl-1* by TCTP. *Mol Cell Biol*, 25(8), 3117-3126.
- Lolli, G., & Johnson, L. N. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle*, 4(4), 572-577.
- Loschi, L., Brokx, S. J., Hills, T. L., Zhang, G., Bertero, M. G., Lovering, A. L., Weiner, J. H., & Strynadka, N. C. (2004). Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase. *J Biol Chem*, 279(48), 50391-50400.

- Lowy, D. R., Johnson, M. R., DeClue, J. E., Cen, H., Zhang, K., Papageorge, A. G., Vass, W. C., Willumsen, B. M., Valentine, M. B., & Look, A. T. (1993). Cell transformation by ras and regulation of its protein product. *Ciba Found Symp*, 176, 67-80; discussion 80-64.
- Lutomski, D., Fouillit, M., Bourin, P., Mellottee, D., Denize, N., Pontet, M., Bladier, D., Caron, M., & Joubert-Caron, R. (1997). Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation. *Glycobiology*, 7(8), 1193-1199.
- MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., Langdon, J. M., & Meshnick, S. R. (2001). Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10829-10832.
- MacDonald, S. M., Paznekas, W. A., & Jabs, E. W. (1999). Chromosomal localization of tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1) encoding the human histamine releasing factor (HRF) to 13q12-->q14. *Cytogenet Cell Genet*, 84(1-2), 128-129.
- MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J., & Lichtenstein, L. M. (1995). Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*, 269(5224), 688-690.
- Machlenkin, A., Paz, A., Bar Haim, E., Goldberger, O., Finkel, E., Tirosh, B., Volovitz, I., Vadai, E., Lugassy, G., Cytron, S., Lemonnier, F., Tzehoval, E., & Eisenbach, L. (2005). Human CTL epitopes prostatic acid phosphatase-3 and six-transmembrane epithelial antigen of prostate-3 as candidates for prostate cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 65(14), 6435-6442.
- Macpherson, I. A. (1971). Reversion in cells transformed by tumour viruses. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 177(46), 41-48.
- Maizel, A., Tassetto, M., Filhol, O., Cochet, C., Prochiantz, A., & Joliot, A. (2002). Engrailed homeoprotein secretion is a regulated process. *Development*, 129(15), 3545-3553.
- Mak, C. H., Poon, M. W., Lun, H. M., Kwok, P. Y., & Ko, R. C. (2007). Heat-inducible translationally controlled tumor protein of *Trichinella pseudospiralis*: cloning and regulation of gene expression. *Parasitol Res*, 100(5), 1105-1111.
- Mak, C. H., Su, K. W., & Ko, R. C. (2001). Identification of some heat-induced genes of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 123(Pt 3), 293-300.
- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K., Sedlak, T. W., Sloetjes, A. W., de Witte, T., Waksman, G., & Korsmeyer, S. J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, 91(8), 2991-2997.
- Mellman, I., & Simons, K. (1992). The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell*, 68(5), 829-840.
- Metzger, D., & Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol*, 10(5), 470-476.
- Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J. H., Mercer, W. E., & Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*, 54(13), 3391-3395.

- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., & Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11(3), 577-590.
- Milner, J., & Medcalf, E. A. (1990). Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135. *J Mol Biol*, 216(3), 481-484.
- Miremadi, A., Oestergaard, M. Z., Pharoah, P. D., & Caldas, C. (2007). Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1, R28-49.
- Mitsushita, J., Lambeth, J. D., & Kamata, T. (2004). The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res*, 64(10), 3580-3585.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., & Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*, 54(12), 3131-3135.
- Moldes, M., Lasnier, F., Gauthereau, X., Klein, C., Pairault, J., Feve, B., & Chambaut-Guerin, A. M. (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), 33938-33946.
- Molina, H., Horn, D. M., Tang, N., Mathivanan, S., & Pandey, A. (2007). Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7), 2199-2204.
- Morse, M. A., Garst, J., Osada, T., Khan, S., Hobeika, A., Clay, T. M., Valente, N., Shreeniwas, R., Sutton, M. A., Delcayre, A., Hsu, D. H., Le Pecq, J. B., & Lyerly, H. K. (2005). A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Transl Med*, 3(1), 9.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*, 270(5233), 86-90.
- Mulenga, A., Macaluso, K. R., Simser, J. A., & Azad, A. F. (2003). The American dog tick, *Dermacentor variabilis*, encodes a functional histamine release factor homolog. *Insect Biochem Mol Biol*, 33(9), 911-919.
- Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221-234.
- Myer, D. L., Bahassi el, M., & Stambrook, P. J. (2005). The Plk3-Cdc25 circuit. *Oncogene*, 24(2), 299-305.
- Nachmias, B., Ashhab, Y., & Ben-Yehuda, D. (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol*, 14(4), 231-243.
- Neilands, J. B. (1981). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr*, 1, 27-46.

- Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J. P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., der Sarkissan, H., Cazes, L., Le Paslier, D., Le Gall, I., Israeli, D., Dausset, J., Sigaux, F., Chumakov, I., Oren, M., Calvo, F., Amson, R. B., Cohen, D., & Telerman, A. (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), 9039-9042.
- Nibuya, M., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, 16(7), 2365-2372.
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22(8), 299-306.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem*, 270(10), 2109-2119.
- Noda, M., Selinger, Z., Scolnick, E. M., & Bassin, R. H. (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), 5602-5606.
- Norbeck, J., & Blomberg, A. (1997). Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast*, 13(16), 1519-1534.
- Oda, Y., Yamamoto, H., Takahira, T., Kobayashi, C., Kawaguchi, K., Tateishi, N., Nozuka, Y., Tamiya, S., Tanaka, K., Matsuda, S., Yokoyama, R., Iwamoto, Y., & Tsuneyoshi, M. (2005). Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis. *J Pathol*, 207(4), 410-421.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., & Fleming, M. D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, 37(11), 1264-1269.
- Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A., & Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood*, 108(4), 1388-1394.
- Oikawa, K., Ohbayashi, T., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Teshima, S., Rokutan, K., Mukai, K., & Kuroda, M. (2002). Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(3), 984-987.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol*, 4(2), 111-116.
- Ozoren, N., & El-Deiry, W. S. (2003). Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 13(2), 135-147.

- Packham, G., & Stevenson, F. K. (2005). Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 114(4), 441-449.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189(4200), 347-358.
- Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.
- Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W., & Elledge, S. J. (1995). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science*, 267(5200), 1024-1027.
- Passer, B. J., Nancy-Portebois, V., Amzallag, N., Prieur, S., Cans, C., Roborel de Climens, A., Fiucci, G., Bouvard, V., Tuynder, M., Susini, L., Morchoisne, S., Crible, V., Lespagnol, A., Dausset, J., Oren, M., Amson, R., & Telerman, A. (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), 2284-2289.
- Peche, H., Renaudin, K., Beriou, G., Merieau, E., Amigorena, S., & Cuturi, M. C. (2006). Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant*, 6(7), 1541-1550.
- Peters, P. J., Geuze, H. J., Van der Donk, H. A., Slot, J. W., Griffith, J. M., Stam, N. J., Clevers, H. C., & Borst, J. (1989). Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 19(8), 1469-1475.
- Pisitkun, T., Shen, R. F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36), 13368-13373.
- Pollack, R. E., Green, H., & Todaro, G. J. (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), 126-133.
- Porkka, K. P., Helenius, M. A., & Visakorpi, T. (2002). Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate. *Lab Invest*, 82(11), 1573-1582.
- Porkka, K. P., Nupponen, N. N., Tammela, T. L., Vessella, R. L., & Visakorpi, T. (2003). Human pHyde is not a classical tumor suppressor gene in prostate cancer. *Int J Cancer*, 106(5), 729-735.
- Porkka, K. P., & Visakorpi, T. (2001). Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array. *J Pathol*, 193(1), 73-79.
- Price, D. M., Jin, Z., Rabinovitch, S., & Campbell, S. D. (2002). Ectopic expression of the *Drosophila* Cdk1 inhibitory kinases, Wee1 and Myt1, interferes with the second mitotic wave and disrupts pattern formation during eye development. *Genetics*, 161(2), 721-731.

- Rabinowitz, Z., & Sachs, L. (1968). Reversion of properties in cells transformed by polyoma virus. *Nature*, 220(5173), 1203-1206.
- Rao, K. V., Chen, L., Gnanasekar, M., & Ramaswamy, K. (2002). Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 277(34), 31207-31213.
- Raposo, G., Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., & Desaymard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell*, 8(12), 2631-2645.
- Reed, J. C., Miyashita, T., Krajewski, S., Takayama, S., Aime-Sempe, C., Kitada, S., Sato, T., Wang, H. G., Harigai, M., Hanada, M., Krajewska, M., Kochel, K., Millan, J., & Kobayashi, H. (1996). Bcl-2 family proteins and the regulation of programmed cell death in leukemia and lymphoma. *Cancer Treat Res*, 84, 31-72.
- Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M. M., Loda, M., & Witte, O. N. (1998). Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(4), 1735-1740.
- Rialland, P., Lankar, D., Raposo, G., Bonnerot, C., & Hubert, P. (2006). BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells. *Biol Cell*, 98(8), 491-501.
- Rinaldy, A. R., Menon, R. P., Lerner, J. L., & Steiner, M. S. (2000). Role of pHyde novel gene product as an intrinsic factor for apoptotic pathway in prostate cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 27 Suppl 2, 215-222.
- Rinnerthaler, M., Jarolim, S., Heeren, G., Palle, E., Perju, S., Klinger, H., Bogengruber, E., Madeo, F., Braun, R. J., Breitenbach-Koller, L., Breitenbach, M., & Laun, P. (2006). MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1757(5-6), 631-638.
- Rodeberg, D. A., Nuss, R. A., Elswa, S. F., & Celis, E. (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), 4545-4552.
- Rogers, S., Wells, R., & Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, 234(4774), 364-368.
- Rommelaere, J., & Cornelis, J. J. (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods*, 33(3), 233-251.
- Roperch, J. P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pasturaud, P., Gendron, M. C., Dausset, J., Oren, M., Amson, R. B., & Telerman, A. (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), 8070-8073.

- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(463), 194-199.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68(4), 673-682.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J., & Martinez-Climent, J. A. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106(9), 3214-3222.
- Rutherford, J. C., Jaron, S., & Winge, D. R. (2003). Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem*, 278(30), 27636-27643.
- Sager, R. (1985). Genetic suppression of tumor formation. *Adv Cancer Res*, 44, 43-68.
- Sanchez, J. C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M. R., James, R., Deshusses, J., & Hochstrasser, D. (1997). Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis*, 18(1), 150-155.
- Sanchez-Pulido, L., Rojas, A. M., Valencia, A., Martinez, A. C., & Andrade, M. A. (2004). ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer*, 4, 98.
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic*, 6(2), 131-143.
- Savina, A., Furlan, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, 278(22), 20083-20090.
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*, 64(20), 7183-7190.
- Schmidt, I., Fahling, M., Nafz, B., Skalweit, A., & Thiele, B. J. (2007). Induction of translationally controlled tumor protein (TCTP) by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Febs J*.
- Schroeder, J. T., Lichtenstein, L. M., & MacDonald, S. M. (1996). An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J Exp Med*, 183(3), 1265-1270.
- Schroeder, J. T., Lichtenstein, L. M., & MacDonald, S. M. (1997). Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *J Immunol*, 159(1), 447-452.

- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., & Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*, 300(5616), 135-139.
- Segura, E., Amigorena, S., & Thery, C. (2005). Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis*, 35(2), 89-93.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Veron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., & Thery, C. (2005). ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*, 106(1), 216-223.
- Shatwell, K. P., Dancis, A., Cross, A. R., Klausner, R. D., & Segal, A. W. (1996). The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 271(24), 14240-14244.
- Shaw, G. C., Cope, J. J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G. E., Gwynn, B., Lambert, A. J., Wingert, R. A., Traver, D., Trede, N. S., Barut, B. A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M. J., Peters, L. L., Kaplan, J., Zon, L. I., & Paw, B. H. (2006). Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, 440(7080), 96-100.
- Sinha, P., Kohl, S., Fischer, J., Hutter, G., Kern, M., Kottgen, E., Dietel, M., Lage, H., Schnolzer, M., & Schadendorf, D. (2000). Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 21(14), 3048-3057.
- Stanbridge, E. J. (1976). Suppression of malignancy in human cells. *Nature*, 260(5546), 17-20.
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260(5547), 170-173.
- Steiner, M. S., Zhang, X., Wang, Y., & Lu, Y. (2000). Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde. *Cancer Res*, 60(16), 4419-4425.
- Stephenson, J. R., Reynolds, R. K., & Aaronson, S. A. (1973). Characterization of morphologic revertants of murine and avian sarcoma virus-transformed cells. *J Virol*, 11(2), 218-222.
- Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., & Lyko, F. (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 66(5), 2794-2800.
- Strobl, J. S., & Peterson, V. A. (1992). Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13. *J Pharmacol Exp Ther*, 263(1), 186-193.

- Sturzenbaum, S. R., Kille, P., & Morgan, A. J. (1998). Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*1. *Biochim Biophys Acta*, 1398(3), 294-304.
- Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205-212.
- Sugars, K. L., Budhram-Mahadeo, V., Packham, G., & Latchman, D. S. (2001). A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53. *Nucleic Acids Res*, 29(22), 4530-4540.
- Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A. R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J. C., Martinou, J. C., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., & Telerman, A. (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ*.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., & Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(24), 7837-7841.
- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15), 1803-1815.
- Teasdale, R. D., & Jackson, M. R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12, 27-54.
- Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J., & Amson, R. (1993). A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8702-8706.
- Teshima, S., Rokutan, K., Nikawa, T., & Kishi, K. (1998). Macrophage colony-stimulating factor stimulates synthesis and secretion of a mouse homolog of a human IgE-dependent histamine-releasing factor by macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol*, 161(11), 6356-6366.
- Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P., & Craven, C. J. (2001). Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol*, 8(8), 701-704.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 166(12), 7309-7318.
- Thiele, H., Berger, M., Lenzner, C., Kuhn, H., & Thiele, B. J. (1998). Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. *Eur J Biochem*, 257(1), 62-68.

- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., & Thiele, B. J. (2000). Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *Eur J Biochem*, 267(17), 5473-5481.
- Thomas, G., & Thomas, G. (1986). Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 1), 2137-2144.
- Thomas, G., Thomas, G., & Luther, H. (1981). Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(9), 5712-5716.
- Thompson, H. G., Harris, J. W., Wold, B. J., Quake, S. R., & Brody, J. P. (2002). Identification and confirmation of a module of coexpressed genes. *Genome Res*, 12(10), 1517-1522.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., & van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell*, 13(1), 238-250.
- Timmer, J. C., & Salvesen, G. S. (2007). Caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14(1), 66-72.
- Toda, T., Iida, A., Miwa, T., Nakamura, Y., & Imai, T. (1994). Isolation and characterization of a novel gene encoding nuclear protein at a locus (D11S636) tightly linked to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Hum Mol Genet*, 3(3), 465-470.
- Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Geant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., Moras, D., Amson, R., & Telerman, A. (2004). Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(43), 15364-15369.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R., & Telerman, A. (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), 14976-14981.
- van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, 121(2), 337-349.
- Van Pachterbeke, C., Tuynder, M., Cosyn, J. P., Lespagnard, L., Larsimont, D., & Rommelaere, J. (1993). Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures. *Int J Cancer*, 55(4), 672-677.
- Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G. A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., Qiu, W., Sharma, S., Diassiti, A., Alam, Z., Melone, M., Mulichak, A., Wernimont, A., Bray, J., Loppnau, P., Plotnikova, O., Newberry, K., Sundararajan, E., Houston, S., Walker, J., Tempel, W., Bochkarev, A., Kozieradzki, I., Edwards, A., Arrowsmith, C., Roos, D., Kain, K., & Hui, R. (2007). Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related Apicomplexan organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 151(1), 100-110.

- Velculescu, V. E., Madden, S. L., Zhang, L., Lash, A. E., Yu, J., Rago, C., Lal, A., Wang, C. J., Beaudry, G. A., Ciriello, K. M., Cook, B. P., Dufault, M. R., Ferguson, A. T., Gao, Y., He, T. C., Hermeking, H., Hiraldo, S. K., Hwang, P. M., Lopez, M. A., Luderer, H. F., Mathews, B., Petroziello, J. M., Polyak, K., Zawel, L., Kinzler, K. W., & et al. (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet*, 23(4), 387-388.
- Ventura, A., Kirsch, D. G., McLaughlin, M. E., Tuveson, D. A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E. E., Weissleder, R., & Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661-665.
- Vercoutter-Edouart, A. S., Czeszak, X., Crepin, M., Lemoine, J., Boilly, B., Le Bourhis, X., Peyrat, J. P., & Hondermarck, H. (2001). Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 262(1), 59-68.
- Vidal, M., Mangeat, P., & Hoekstra, D. (1997). Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci*, 110 (Pt 16), 1867-1877.
- Vidal, M., Sainte-Marie, J., Philippot, J. R., & Bienvenue, A. (1989). Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase". *J Cell Physiol*, 140(3), 455-462.
- Vogel, A., & Pollack, R. (1974). Isolation and characterization of revertant cell lines. VI. Susceptibility of revertants to retransformation by simian virus 40 and murine sarcoma virus. *J Virol*, 14(6), 1404-1410.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9(4), 138-141.
- von Rozycki, T., Yen, M. R., Lende, E. E., & Saier, M. H., Jr. (2004). The YedZ family: possible heme binding proteins that can be fused to transporters and electron carriers. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 8(3), 129-140.
- Vonakis, B. M., Macglashan, D. W., Jr., Vilarino, N., Langdon, J. M., Scott, R. S., & Macdonald, S. M. (2008). Distinct characteristics of signal transduction events by histamine-releasing factor/translationally controlled tumor protein (HRF/TCTP)-induced priming and activation of human basophils. *Blood*, 111(4), 1789-1796.
- Vonakis, B. M., Sora, R., Langdon, J. M., Casolaro, V., & MacDonald, S. M. (2003). Inhibition of cytokine gene transcription by the human recombinant histamine-releasing factor in human T lymphocytes. *J Immunol*, 171(7), 3742-3750.
- Waki, H., & Tontonoz, P. (2007). STAMPing out Inflammation. *Cell*, 129(3), 451-452.
- Wakisaka, N., Murono, S., Yoshizaki, T., Furukawa, M., & Pagano, J. S. (2002). Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2. *Cancer Res*, 62(21), 6337-6344.

- Walsh, B. J., Gooley, A. A., Williams, K. L., & Breit, S. N. (1995). Identification of macrophage activation associated proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *J Leukoc Biol*, 57(3), 507-512.
- Wantke, F., MacGlashan, D. W., Langdon, J. M., & MacDonald, S. M. (1999). The human recombinant histamine releasing factor: functional evidence that it does not bind to the IgE molecule. *J Allergy Clin Immunol*, 103(4), 642-648.
- Warkentin, E., Mamat, B., Sordel-Klippert, M., Wicke, M., Thauer, R. K., Iwata, M., Iwata, S., Ermler, U., & Shima, S. (2001). Structures of F420H2:NADP⁺ oxidoreductase with and without its substrates bound. *Embo J*, 20(23), 6561-6569.
- Waterston, R. H., et al., (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562.
- Watson, R. W., & Fitzpatrick, J. M. (2005). Targeting apoptosis in prostate cancer: focus on caspases and inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int*, 96 Suppl 2, 30-34.
- Waugh, R. E., McKenney, J. B., Bauserman, R. G., Brooks, D. M., Valeri, C. R., & Snyder, L. M. (1997). Surface area and volume changes during maturation of reticulocytes in the circulation of the baboon. *J Lab Clin Med*, 129(5), 527-535.
- Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254(5035), 1138-1146.
- Wellen, K. E., Fucho, R., Gregor, M. F., Furuhashi, M., Morgan, C., Lindstad, T., Vaillancourt, E., Gorgun, C. Z., Saatcioglu, F., & Hotamisligil, G. S. (2007). Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis. *Cell*, 129(3), 537-548.
- Wolf, B. B., Schuler, M., Li, W., Eggers-Sedlet, B., Lee, W., Taylor, P., Fitzgerald, P., Mills, G. B., & Green, D. R. (2001). Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J Biol Chem*, 276(36), 34244-34251.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., They, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., & Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, 7(3), 297-303.
- Xu, A., Bellamy, A. R., & Taylor, J. A. (1999). Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem J*, 342 Pt 3, 683-689.
- Yan, L., Fei, K., Bridge, D., & Sarras, M. P., Jr. (2000). A cnidarian homologue of translationally controlled tumor protein (P23/TCTP). *Dev Genes Evol*, 210(10), 507-511.
- Yang, D., Holt, G. E., Velders, M. P., Kwon, E. D., & Kast, W. M. (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), 5857-5860.
- Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., Mirkovic, D., Nguyen, J., Wang, H., & Yang, X. F. (2005). An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene*, 24(30), 4778-4788.
- Yarm, F. R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol*, 22(17), 6209-6221.
- Yenofsky, R., Bergmann, I., & Brawerman, G. (1982). Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(19), 5876-5880.
- Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, A., & Brawerman, G. (1983). Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol*, 3(7), 1197-1203.
- Yoneda, K., Rokutan, K., Nakamura, Y., Yanagawa, H., Kondo-Teshima, S., & Sone, S. (2004). Stimulation of human bronchial epithelial cells by IgE-dependent histamine-releasing factor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(1), L174-181.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., & Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352(6333), 345-347.
- Yoon, T., Jung, J., Kim, M., Lee, K. M., Choi, E. C., & Lee, K. (2000). Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system. *Arch Biochem Biophys*, 384(2), 379-382.
- Yoon, T., Kim, M., & Lee, K. (2006). Inhibition of Na,K-ATPase-suppressive activity of translationally controlled tumor protein by sorting nexin 6. *FEBS Lett*, 580(14), 3558-3564.
- Yu, X., Harris, S. L., & Levine, A. J. (2006). The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*, 66(9), 4795-4801.
- Zetterberg, A., Larsson, O., & Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*, 7(6), 835-842.
- Zhang, & Wang, H. (2000). MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr Pharm Des*, 6(4), 393-416.
- Zhang, A. S., Sheftel, A. D., & Ponka, P. (2006). The anemia of "haemoglobin-deficit" (hbd/hbd) mice is caused by a defect in transferrin cycling. *Exp Hematol*, 34(5), 593-598.
- Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z. H., & Fujise, K. (2002). Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem*, 277(40), 37430-37438.

Zhang, X., Steiner, M. S., Rinaldy, A., & Lu, Y. (2001). Apoptosis induction in prostate cancer cells by a novel gene product, pHyde, involves caspase-3. *Oncogene*, 20(42), 5982-5990.

Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y., & Baba, Y. (2004). Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 53(3), 267-275.

Zinkel, S. S., Hurov, K. E., & Gross, A. (2007). Bid plays a role in the DNA damage response. *Cell*, 130(1), 9-10; author reply 10-11.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med*, 4(5), 594-600.

Ouvrages

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.
Biologie Moléculaire de la cellule
 Flammarion, 4ième édition, 2004

Dalbey R. E., von Heijne G.
Protein Targeting Transport et Translocation
 Academic Press, 2002

Dikic I.
Endosomes
 Springer, 2006

Espinosa E., Chillet P.
Immunologie
 Ellipses, 2006

Hainaut P., Wiman K. W.
25 Years of P53 Research
 Springer, 2005

Lewin B.
Genes VIII
 Prentice-Hall, International Edition, 2004

McPherson A.
Introduction to Macromolecular Crystallography
 Wiley-Liss, 2003

Panthier J. J., Montagutelli X. et Guénet J. L.
Les organismes modèles, génétique de la souris
 Belin, 2003

Rodak B., Fritsma G. A., Doig K.
Hematology : Clinical Principles and Applications
 Saunders Elsevier, 2007

Templeton D. M.
Molecular and Cellular Iron Transport
 Marcel Dekker, 2002

Vogelstein B., Kinzler K. W.
The Genetic Basis of Human Cancer
 McGraw-Hill Professional Publishing, 2ième édition, 2002

Weinberg R. A.
The Biology of Cancer
 Garland Science, 2006

Bibliographie personnelle

The P53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with NIX and the MYT1 kinase.

Brent J. Passer†, Vanessa Nancy-Portebois*†, Nathalie Amzallag*†, Sylvie Prieur*, Christophe Cans*, Aude Roborel de Climens*, Giusy Fiucci*, Véronique Bouvard*, Marcel Tuynder*, Laurent Susini*, Stephanie Morchoisne*, Virginie Crible*, **Alexandra Lespagnol***, Jean Dausset‡, Moshe Oren§, Robert Amson*, and Adam Telerman*¶*
Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 100, Number 5, pages 2284-2289, March 4 2003.

Genomic organization and expression of mouse *tpt1* gene.

Giusy Fiucci, **Alexandra Lespagnol**, Pamela Stumptner-Cuvelette, Séverine Beaucourt, Dominique Duflaut, Laurent Susini, Robert Amson, and Adam Telerman*
Genomics. Volume 81, Number 6, pages 570-578, Jun 2003.

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

Giusy Fiucci†, Séverine Beaucourt*†, Dominique Duflaut*, **Alexandra Lespagnol***, Pamela Stumptner-Cuvelette*, Anne Géant*, Gilles Buchwalter‡, Marcel Tuynder*, Laurent Susini*, Jean-Michel Lassalle§, Christine Wasylk‡, Bohdan Wasylk‡, Moshe Oren¶, Robert Amson*, and Adam Telerman**
Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 101, Number 10, pages 3510-3515, March 9 2004.

Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion.

Marcel Tuynder, Giusy Fiucci*, Sylvie Prieur*, **Alexandra Lespagnol***, Anne Geant*, Severine Beaucourt*, Dominique Duflaut*, Stephanie Besse*, Laurent Susini*, Jean Cavarelli†, Dino Moras†, Robert Amson*‡, and Adam Telerman*‡§*
Proc Natl Acad Sci U S A. Volume 101, Number 43, pages 15364-15369, October 26 2004.

TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.

*Laurent Susini^{1,6}, Stephanie Besse^{1,6}, Dominique Duflaut^{1,6}, **Alexandra Lespagnol^{1,6}**, Chantal Beekman^{2,6}, Giusy Fiucci¹, Andrew R. Atkinson³, Didier Busso³, Pierre Poussin³, Jean-Christophe Marine², Jean-Claude Martinou⁴, Jean Cavarelli³, Dino Moras³, Robert Amson^{1,5} and Adam Telerman^{*1,5}*
Cell Death and Differentiation Nature Publishing Group Advance online publication, 15 February 2008.

Annexes

Annexe 1

Les gènes différenciellement régulés lors de la réversion tumorale

(D'après Tuynder et al., 2002)

Supporting table, which was published as supporting information on the PNAS web site.

Table 1. Differential gene expression in tumor reversion

Comparative gene expression analysis between tumor cells (U937, K562, BT20, T47D, MDA-MB231) and revertants (US4.2, KS6, BT20S, T47DS, MDA-MB231S). Comparative gene expression analysis between U937 and U937 transfected with SIAH-1 as well as MCF7 and MCF7 transfected with SIAH-1. TSAP, tumor Suppression activated pathway; TSIP, tumor Suppression inhibited pathway.

Table 1: see next page.

Accession Number	Gene description	U937 / US4.2		Northern Q-PCR	MPSS						
		Differential display MEGASORT	MPSS U937 US4.2		K562 / K56	BT20 / BT20S	T47D / T47DS	MB231 / MB231S	U937 / U937Siah1	MCF7 / MCF7Siah1	
CHROMATIN STRUCTURE											
U26312	heterochromatin protein HP1Hsgamma			♦							
NM_005196	centromere protein F (350/400kD, mitotin)		102 23	♦							
M21339	non-histone chromosomal protein HMG-14		1704 674	♦							
AF020043	chromosome-associated polypeptide (HCAP)			♦							
NM_006306	SMC 1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1 (yeast)		1214 868	♦							
DNA REPLICATION											
AF128893	telomerase reverse transcriptase		289 596	♦							
AF181897	WRN		1518 1170	♦							
L47276	alpha topoisomerase truncated-form			♦							
DNA REPAIR											
J04718	proliferating cell nuclear antigen		3594 2549	♦							
AF165088	Rad51			♦							
NM_003579	homologous to S. cerevisiae RAD54			♦							
L47234	ERCC2			♦							
REGULATORS OF TRANSCRIPTION											
NM_001675	activating transcription factor 4			♦							
AF161886	myeloid zinc finger protein 1 splice variants		866 404	♦							
M90357	basic transcription factor 3a		84 77	♦							
NM_006406	thioredoxin peroxidase (antioxidant enzyme)			♦							
AF060568	promyelocytic leukemia zinc finger protein		208 93	♦							
NM_003146	structure specific recognition protein1		24 0	♦							
U29175	transcriptional activator (BRG1)			♦							
M81601	transcription elongation factor (SII)			♦							
L11672	Kruppel related zinc finger protein (HTF10)			♦							
AF105427	transcription factor RFX-B (RFXB)			♦							
J05448	RNA polymerase subunit HRPB 33			♦							
AF084530	cyclin-D binding Myb-like protein		80 19	♦							
AF043431	retinoblastoma-interacting protein (RBBP8)		404 229	♦							
AB012286	5' region of integrin-beta 4 gene		3 177	♦							
AB022785	ASH2L gene, similar to Drosophila ash2 gene		866 404	♦							
NM_014938	Mix interactor (MONDOA)			♦							
NM_015928	androgen-induced prostate proliferative shutoff associated protein			♦							
U22376	c-myb		28 0	♦							
AF003530	homeobox protein CDX4		533 314	♦							
NM_003035	TAL1 (SCL) interrupting locus (SIL)		208 93	♦							
NM_005080	X-box binding protein 1		1083 565	♦							
RNA TRANSPORT AND PROCESSING											
U87279	splicing factor SRp30c			♦							
M16342	nuclear ribonucleoprotein particle C		1020 356	♦							
NM_014280	splicing factor similar to dnaJ (SPF31)			♦							
XM_038972	splicing factor 3b, subunit 1, 155kD			♦							
M29065	hnRNP A2 protein			♦							
NM_031243	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1			♦							
NM_002136	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1		1924 1135	♦							
NM_004768	splicing factor, arginine/serine-rich 11		77 180	♦							
NM_002568	poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1		36 0	♦							
NM_032881	U7 snRNP-specific Sm-like protein LSM10			♦							
NM_015629	pre-mRNA processing factor 31 homolog (yeast)			♦							
NM_006196	poly(rC) binding protein 1			♦							
X70944	PTB-associated splicing factor			♦							
RIBOSOMAL PROTEINS											
L20868	ribosomal protein L4		4185 2606	♦							
NM_000969	ribosomal protein L5		568 294	♦							
NM_000971	ribosomal protein L7		4007 2882	♦							
NM_000972	ribosomal protein L7a		4869 3268	♦							
NM_000661	ribosomal protein L9		11767 7502	♦							
NM_006013	ribosomal protein L10		6316 5377	♦							
NM_000975	ribosomal protein L11			♦							
NM_000977	ribosomal protein L13		3396 2253	♦							
NM_012423	ribosomal protein L13a		9630 6585	♦							
NM_002948	ribosomal protein L15		4381 2457	♦							
NM_000980	ribosomal protein L18a		4685 2229	♦							
NM_000982	ribosomal protein L21			♦							
NM_000983	ribosomal protein L22		3295 2161	♦							
NM_000984	ribosomal protein L23a		5610 4713	♦							
L05095	ribosomal protein L30		7561 5398	♦							
NM_000994	ribosomal protein L32		6524 3304	♦							
NM_007209	ribosomal protein L35		4222 2584	♦							
NM_021029	ribosomal protein L36a		38 3	♦							
NM_000998	ribosomal protein L37a		6446 4848	♦							
NM_001000	ribosomal protein L39		14309 8695	♦							
XM_037459	ribosomal protein S3A			♦							
NM_001012	ribosomal protein S8		4234 5299	♦							

Accession Number	Gene description	U937 / US4.2		Northern Q-PCR	MPSS						
		Differential display MEGASORT	MPSS U937 US4.2		K562 / K56	BT20 / BT20S	T47D / T47DS	MB231 / MB231S	U937 / U937Siah1	MCF7 / MCF7Siah1	
CELL CYCLE											
AB061839	ribosomal protein S9			♦							
M13934	ribosomal protein S14		6132 3997	♦							
NM_001019	ribosomal protein S15a		3516 2973	♦							
NM_001021	ribosomal protein S17		9261 6572	♦							
NM_022551	ribosomal protein S18		5671 2820	♦							
NM_001022	ribosomal protein S19		7492 8673	♦							
NM_001023	ribosomal protein S20		95 10	♦							
U12202	ribosomal protein S24			♦							
U41448	ribosomal protein S26		3181 2481	♦							
NM_001031	ribosomal protein S28		5671 2820	♦							
U14973	ribosomal protein S29		4420 2170	♦							
M17885	acidic ribosomal phosphoprotein P0		18191 10876	♦							
PROTEIN SYNTHESIS											
M27024	heat shock protein (HSP89-alpha)		2963 3488	♦							
AF255307	cyclin T1			♦							
NM_015965	CGI-39 protein; cell death-regulatory protein GRIM19		18191 10876	♦							
AF010238	von Hippel-Lindau tumor suppressor		363 197	♦							
NM_032637	S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)			♦							
AJ010395	DKC1		222 40	♦							
AB000381	GPI-anchored molecule-like protein		64 178	♦							
AB002059	P2XM		45 0	♦							
AF117829	RICK			♦							
PROTEIN FOLDING/MODIFICATION/TURNOVER											
BC002594	dolichyl-diphosphooligosaccharide-glycosyltransferase			♦							
NM_021130	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)		208 93	♦							
S82372	cyclophilin-A like		7840 5754	♦							
AF054185	proteasome subunit HSPC			♦							
J04809	cytosolic adenylate kinase (AK1)			♦							
AJ132637	ATP-dependent metalloprotease YME1L			♦							
M35531	GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase			♦							
AF151079	HSPC245			♦							
AF014398	myo-inositol monophosphatase 2			♦							
E10341	pro-cathepsin B			♦							
XM_033922	ubiquitin specific protease 10			♦							
AF023268	ck2 kinase		42 0	♦							
X95677	ArgPIIB protein		3241 622	♦							
CELL SURFACE PROTEINS/CELL ADHESION/EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS											
J03799	laminin-binding protein		4141 1680	♦							
AF217411	neuroigin 3 isoform			♦							
AF187881	leukointegrin alpha d		60 0	♦							
AF166339	integrin alpha 6 (ITGA6)		208 93	♦							
AF005963	protocadherin 43		3 147	♦							
AF007544	prostate-specific membrane antigen		208 93	♦							
NM_012072	complement component 1, q subcomponent, receptor 1		0 56	♦							
NM_001642	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2		533 314	♦							
AF099810	neurexin III-alpha		363 197	♦							
NP_443183	TdT binding protein; similar to synaptotagmin 1			♦							
AF247661	LDC4			♦							
AF184110	cyclophilin-related protein (NKTR)		117 6	♦							
CYTOSKELETAL PROTEINS											
X04588	cytoskeletal tropomyosin		97 190	♦							
NM_002823	prothymosin, alpha (gene sequence 28)		45 3	♦							
AA601082	tubulin alpha chain		14048 8873	♦							
NM_002473	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle			♦							
NM_004986	kinectin 1 (kinesin receptor)		518 301	♦							
M17733	thymosin beta-4		2756 1846	♦							

■ up regulated ■ down regulated

Accession Number	Gene description	Differential display MEGASORT		U937 / US4.2		MPSS								
				U937	US4.2	MPSS	Northern	Q-PCR	K562 / K56	BT20 / BT20S	T47D / T47DS	MB231 / MB231S	U937 / U937Siah1	MCF7 / MCF7Siah1
TRANSPORT														
AF151097	voltage-dependent anion channel (VDAC1)			991	617									
L19444	neutral amino acid transporter (SATT)													
AB015355	natural resistance-associated macrophageprotein 2			64	178									
AJ271729	glucose-regulated protein (HSPA5 gene)													

METABOLISM														
U62891	deoxyuridine triphosphatase													
NM_001071	thymidylate synthetase													
NM_005165	aldolase C gene for fructose1,6-biphosphate aldolase			105	38									
X14008	lysozyme gene (EC 3.2.1.17)													
M11147	ferritin light chain													
U34343	13kDa differentiation-associated protein			89	12									
NM_001428	enolase 1, (alpha)			6100	5344									
X01784	superoxide dismutase (SOD1)			434	164									
NM_004553	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S			70	3									
NM_001441	fatty acid amide hydrolase													
M34158	ornithine decarboxylase													
NM_005566	lactate dehydrogenase A			2214	2823									
D90086	pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1) beta subunit													
NM_021928	FLJ22649 similar to signal peptidase SPC22/23			10	73									
D16480	mitochondrial enoyl-CoA hydratase													
XM_009082	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)			0	43									
NM_000291	phosphoglycerate kinase 1													
AB045146	thiopurine S-methyltransferase			0	54									
AF000573	homogentisate 1,2-dioxygenase			289	569									
Y10196	PHEX			38	0									
NM_013402	fatty acid desaturase 1													
NM_017743	dipeptidylpeptidase 8													
NM_058167	ubiquitin conjugating enzyme 6													

GROWTH FACTORS AND CYTOKINES														
D16431	hepatoma-derived growth factor			461	754									
AJ400717	tpt1/ TCTP gene for translationally controlled tumor protein			11241	5457									
AF039390	vascular endothelial cell growth inhibitor													
X12830	interleukin-6 receptor													
AY071830	interleukin 9 receptor													

SIGNALING MOLECULES/PROLIFERATION														
L11284	ERK activator kinase (MEK1)			0	31									
NM_006367	adenyl cyclase-associated protein (CAP)													
XM_004632	similar to ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 isoform Rac1b													
Z38108	PEBP2aC Runt domain													
NM_014737	Ras association (RalGDF/AF-6)domain family 2			8	47									
NM_005610	retinoblastoma binding protein 4													
E15653	interferon-gamma-inducing protein													
AF230904	c-Cbl-interacting protein (CIN85)													
HSU95626	ccr2b													
NM_003684	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 1													
X57025	IGF-I mRNA for insulin-like growth factor I													
AB013139	NBS1			3	147									
AB025285	c-ERBB-2			670	244									
AB026436	dual specificity phosphatase MKP-5													
AF125348	caveolin 1			189	469									
AB038490	fukulin			74	10									
Y18000	NF2			570	144									
NM_016630	acid cluster protein 33			550	954									
NM_006990	WAS protein family, member 2			0	40									
AB019691	Centrosome- and Golgi-localized PKN-associated protein			45	0									

MITOCHONDRIAL PROTEINS														
NC_001807	NADH dehydrogenase subunit 1			76	9									
X93334	NADH dehydrogenase subunit 4													
NC_001807	NADH dehydrogenase III			2813	2091									
AF192559	mitochondrial carrier homolog 1 isoform b													
L00016	URF4 gene													
NM_004483	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)													
U12690	mitochondrion cytochrome oxidase subunit II (COII)													
AF035429	cytochrome oxidase subunit I (COI) and subunit II (COII)			11410	16138									
NM_004046	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex			1267	534									
AF070655	F1F0-type ATP synthase subunit g			477	152									

Accession Number	Gene description	Differential display MEGASORT		U937 / US4.2		MPSS								
				U937	US4.2	MPSS	Northern	Q-PCR	K562 / K56	BT20 / BT20S	T47D / T47DS	MB231 / MB231S	U937 / U937Siah1	MCF7 / MCF7Siah1
NM_001685	mitochondrial ATPase coupling factor 6 subunit (ATP5A)			2111	2889									
AB026906	small subunit of cytochrome b of succinate dehydrogenase			372	105									
NM_023937	mitochondrial ribosomal protein L34													

GENES WITH OTHER FUNCTIONS														
AJ246003	spastin protein (spg4)													
AF382002	16S rRNA													
J04182	lysosomal membrane glycoprotein-1													
AF389851	solute carrier family 12 member 8													
AF418272	coagulation factor XIII, A1 polypeptide (F13A1)													
X69723	TP11 gene for triosephosphate isomerase			2570	1903									
AB004064	tomoregulin			11410	16138									
AB001523	TMEM1			208	93									
NM_018321	BRIX			603	407									
D87675	amyloid precursor protein			533	314									
AB009589	Osteomodulin			363	197									
AF184614	p47-phox (NCF1)			222	40									
AF018631	biotinidase (BTD)			307	133									
U93163	MAGE-B2			208	93									
NM_016356	RU2S (RU2)													
NM_001752	catalase			716	251									
AB029343	HCR (a-helix coiled-coil rod homologue)			670	244									
AB042297	6-pyrrovylnetetrahydropterin synthase			289	569									
AF095770	PTH-responsive osteosarcoma D1 protein			11410	16138									

GENES WITH UNKNOWN FUNCTION														
XM_055641	similar to gag protein (LOC 115283)													
AB019568	mRNA expressed only in placental villi, clone SMAP83			19601	8159									
AF097485	transducin beta-like 2			289	569									
AF114156	Y-linked zinc finger protein			48	3									
NM_033788	similar to figetin-like 1 (LOC90728)													
AF161477	HSPC128													
AF151053	HSPC219													
XM_028213	up-regulated by BCG-CWS (LOC64116)													
AF318323	pp11741 mRNA													
NM_020179	FN5 protein													
U43374	normal keratinocyte													
D87022	immunoglobulin lambda gene locus DNA, clone:88E1													
D20957	promyelocyte cDNA mp1369													
NM_016047	CGI-110 protein (LOC51639)			489	76									
AF151855	CGI-97 protein													
NM_014503	down-regulated in metastasis (DRIM)													
AF242864	coxackie virus and adenovirus receptor													
D42041	KIAA0088													
NM_014666	KIAA0171													
NM_014826	KIAA0451													
NM_015179	KIAA0690													
AB014562	KIAA0662													
AC008085	clone UWGC:djs228 from 7q31													
AW975480	EST387589													
AF143869	clone IMAGE:111469													
BC014967	clone MGC:23084 IMAGE:4856728													

Annexe 2**Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: Identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter.**

Giusy Fiucci*†, Séverine Beaucourt*†, Dominique Duflaut*, Alexandra Lespagnol*, Pamela Stumptner-Cuvelette*, Anne Géant*, Gilles Buchwalter‡, Marcel Tuynnder*, Laurent Susini*, Jean-Michel Lassalle§, Christine Wasyluk‡, Bohdan Wasyluk‡, Moshe Oren¶, Robert Amson*, and Adam Telerman*

Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.
Volume 101, Number 10, pages 3510-3515, March 9 2004.

**Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; †Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale Universite Louis Pasteur, 1 Rue Laurent Fries, BP10142, 67404 Illkirch Cedex, France; §Laboratoire d’Ethologie et Psychologie Animale, Centre National de la Recherche Scientifique- Unite Mixte de Recherche 5550, Universite Paul Sabatier, 31062 Toulouse Cedex 4, France; and ¶Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel*

Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: Identification of the functional p53 responsive element in the *siah-1b* promoter

Giusy Fiucci^{*†}, Séverine Beaucourt^{*†}, Dominique Duflaut^{*}, Alexandra Lespagnol^{*}, Pamela Stumptner-Cuvelette^{*}, Anne Géant^{*}, Gilles Buchwalter[‡], Marcel Tuynder^{*}, Laurent Susini^{*}, Jean-Michel Lassalle[§], Christine Wasylyk[‡], Bohdan Wasylyk[‡], Moshe Oren[¶], Robert Amson^{*}, and Adam Telerman^{*||}

^{*}Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; [†]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université Louis Pasteur, 1 Rue Laurent Fries, BP10142, 67404 Illkirch Cedex, France; [‡]Laboratoire d'Éthologie et Psychologie Animale, Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche 5550, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse Cedex 4, France; and [¶]Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

Communicated by Georges Charpak, European Organization for Nuclear Research, Geneva, Switzerland, January 9, 2004 (received for review December 1, 2003)

Siah proteins are E3 ubiquitin ligases. They are homologues of the *Drosophila* seven in absentia (Sina), a protein required for the R7 photoreceptor development. We have previously found that the expression of human *siah-1* and its mouse homologue *siah-1b* are induced by p53 during apoptosis and tumor reversion. So far, no evidence that the *siah-1b* gene is a direct transcriptional target of p53 has been provided. In the present study we investigate this issue. Northern blot analysis with a specific probe demonstrates an increase in *siah-1b* transcription on activation of endogenous and inducible exogenous p53. To explore whether this effect is directly mediated by p53 we analyzed 20 kb of chromosome X DNA, containing the *siah-1b* locus. A p53-binding site was identified in the *siah-1b* promoter, located at nucleotides –2155/–2103 relative to the translational start site. This site is composed of two half-sites, conforming to the p53-binding consensus sequence but separated by a nonclassical 33-bp spacer. In luciferase assays, p53 induces a substantial increase in *siah-1b* promoter activity. Gel shift and DNase-I-footprinting studies, combined with mutational analysis and chromatin immunoprecipitation, indicate that p53 effectively binds the *siah-1b* promoter *in vitro* and *in vivo*. Thus, the *siah-1b* gene is a direct transcriptional target of p53.

The *Drosophila* seven in absentia (Sina) is a protein required for neuronal differentiation of the R7 photoreceptor cells in the eye of *Drosophila melanogaster* (1). It acts downstream of the Sevenless tyrosine kinase receptor to degrade the transcriptional repressor Tramtrak (2, 3). The *Drosophila* Sina protein and its mammalian Siah homologues are phylogenetically conserved E3 ligases, enzymes involved in ubiquitination and proteasome-mediated degradation of protein substrates. This function is due to their N-terminal RING-finger domain, which recruits ubiquitin-conjugating E2 enzymes and promotes the ligation of ubiquitin to the substrate (4). The two functional human genes, *siah-1* and *siah-2*, are responsible for degradation of Kid, BOB/OBF1, synaptophysin, synphilin, transforming growth factor- β -induced early gene, and TRAF2 (5–10). Siah-1, through the binding and down-modulation of Numb, is a positive regulator of Notch activity (11).

We previously cloned the *siah-1* gene, one of the human homologues of Sina, and showed its overexpression in the epithelium of the small intestine, a well established example of physiological programmed cell death (12). Moreover, in our studies of tumor reversion, we found *siah-1* overexpressed at the mRNA level (12) and at the protein level (13, 14) in cells with a suppressed malignant phenotype. In a 3D basement membrane reconstituted in matrigel, Siah-1 is able to reorganize MCF7 cells in structures similar to those observed with normal breast cells (14, 15). Cells overexpressing Siah-1 showed an increase in apoptosis and gave rise to significantly fewer tumors than the

parental cells when injected into scid/scid mice (13, 14). We previously demonstrated that cells transfected with the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 exhibit high levels of Siah-1 (16) and that Siah-1 has common downstream effectors with p21 and the tumor suppressor p53 (13). Moreover, Siah-1 acts in a complex with Skp1, Eb1, SIP (Siah interacting protein), and adenomatous polyposis coli protein (pAPC) to facilitate, in a p53-dependent manner, the degradation of β -catenin, thus inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation and transformation (17, 18). Pw1/Peg3 is another p53-inducible gene product that cooperates with Siah-1 in promoting cell death (19), whereas BAG-1, an antiapoptotic protein, antagonizes the effect of Siah-1 on apoptosis (20).

The human *siah-1* gene has two murine homologues, *siah-1a* and *siah-1b*, which are widely expressed in various tissues of the embryo and adult (21). The RNA sequences of *siah-1a* and *siah-1b* are 95% homologues with each other, 90% with their human counterpart, and 72% with *Drosophila* Sina. Siah-1a drives the degradation of *c-myc*, a protooncogene involved in cellular proliferation and apoptosis (22), and is necessary for progression past metaphase during meiosis I of spermatogenesis (23). We previously identified *siah-1b* by cDNA differential display as a gene induced by p53 in murine M1 myeloid leukemia cells (24). This finding suggests a function for Siah-1b in apoptosis, as observed for its human homologue. Gene expression analysis revealed that human *siah-1* transcription was significantly correlated with the dosage of p53 (25).

p53 is a homotetrameric transcription factor that can activate or repress the transcription of a series of genes controlling cell cycle progression, apoptosis, DNA repair, and other types of stress response. These genes include p21, MDM2, cyclin G, BAX, noxa, puma, TSAP6, and many others (26–32). The p53 protein is normally short-lived and present at low levels, but in response to stress it accumulates in the nucleus, where it binds to specific DNA sequences within chromatin (33). The consensus p53-binding site is composed of two 10-base half-sites, each conforming to the sequence 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPy-PyPy-3' (where Pu and Py represent purines and pyrimidines, respectively) and separated by a spacer of 0–13 bp (34–37). Based on this consensus sequence, a computer algorithm devel-

Abbreviations: Sina, seven in absentia; p53RE, p53 responsive element; CDS, coding sequence; ChIP, chromatin immunoprecipitation; ActD, Actinomycin D.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession no. AY495086).

[†]G.F. and S.B. contributed equally to this work.

^{||}To whom correspondence should be addressed. E-mail: atelerman@molecular-engines.com.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

oped to identify p53-binding sites in the human genome disclosed *siah-1* as a possible downstream target of p53 (38).

In the present study we show that the *siah-1b* promoter contains a functional p53 responsive element (p53RE), which is able to bind p53 *in vitro* and *in vivo*. Activation of p53 in different cell systems leads to a significant increase in *siah-1b* transcription. Thus, the *siah-1b* gene is a direct transcriptional target of p53.

Materials and Methods

Cell Culture and p53 Activation. The M1 murine myeloid leukemia cell line and its derivative LTR6 clone, expressing a temperature-sensitive p53, have been described (24, 39). In mouse NIH 3T3 cells p53 was activated by incubation with 15 nM Actinomycin D (ActD) (Sigma) for 16–24 h. Human p53-null H1299 cells were grown according to ATCC recommendations.

Cloning and Mutagenesis. The *siah-1b* promoter region (nucleotides –2613/–1694) was cloned into the pGL3-enhancer vector (Promega). The *siah-1b* p53-binding element was mutated (CATG to TATA) either within the first half-site (*siah-1b* mut1) or within the second half-site (*siah-1b* mut2) by using the QuikChange Multi SiteDirected Mutagenesis kit (Stratagene). The p53RE (nucleotides –2160/–2098) was deleted in *siah-1b* Δ with the following primers: forward, 5'-CTAAATGGGTCTCAAGACCTCCCCTGAGA-3', and reverse, 5'-TCTCAGGGGAGGTCTTGAGACCCATTTAG-3'. The distal region of the p21 promoter (nucleotides –7615/–7354 from ATG) containing the p53RE was cloned into the pGL3 enhancer vector by using the following primers: forward, 5'-CTAGGTACCCAGAGGATACCTTGCAAGGCTGCA-3', and reverse, 5'-TATAGATCTTCTCTGTCTCCATTCATGCTCCTCC-3'. The mouse p53 coding sequence (CDS) was cloned in a pCMV vector.

Proteins and Antibodies. The human p53 protein was purified from insect cells infected with recombinant baculovirus. The following antibodies were used: anti-p53 FL-393 (Santa Cruz Biotechnology) and PAb421 (Oncogene Research Products); anti-clathrin heavy chain H-300 (Santa Cruz Biotechnology); anti- α -tubulin B-5-1-2 (Sigma).

Northern Blot Analysis. Northern blot analyses were performed as described (24). The following probes were used: mouse p21 nucleotides 111/340 (accession no. NM_007669), cyclin G1 nucleotides 202/443 (accession no. BC005534), and human GAPDH (Clontech). The probe CDS corresponds to the region nucleotides 251/896 of the human *siah-1* cDNA (accession no. U63295). A specific probe for *siah-1a* (probe a) was designed from the 3' UTR (nucleotides 1676/1934) of *siah-1a* mRNA (accession no. Z19579), whereas the specific probe for *siah-1b* (probe b) corresponds to nucleotides 1/230 in the 5' UTR of the mRNA (accession no. Z19580).

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR. The RACE-PCR was performed by using the Marathon cDNA Amplification kit (Clontech) following the manufacturer's instructions. In brief, mRNA derived from mouse cells was subjected to reverse transcription by using a modified oligo(dT) primer. The resulting cDNAs were ligated to an adaptor and used as templates in 5' or 3' RACE-PCR by using the adaptor-specific primer with *siah-1* primers designed to amplify both *siah-1a* and *siah-1b* cDNA: *siah-1* forward, 5'-CCCCTTGAGTCAACACATAGTGCTGC-3', and *siah-1* reverse, 5'-TGGGGCGACAGTTGCTACAAACAAG-3'. For the 5' amplification we performed a nested PCR by using an internal adaptor-specific primer and the reverse *siah-1b* primer 5'-AGACTCGCCAAGTCATTGTGGATGC-3'.

Luciferase Assays. Cells were transfected with 300 ng of the different *siah-1b* promoter constructs (see *Cloning and Mutagenesis*) and 300 ng of pCMV vector, either empty or expressing mouse p53. Transfection was performed by using LipofectAMINE PLUS reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours after transfection the cells were washed and cell extracts were prepared by using a reporter lysis reagent (25 mM Tris/8 mM MgCl₂/1 mM DTT/1% Triton X-100/15% glycerol). After normalization of each extract for protein content, luciferase activity was measured by using the Victor Luminometer (Perkin-Elmer) after addition of 20 nmol of Luciferin (Roche Diagnostics) and 100 nmol of ATP (Sigma).

Electrophoretic Mobility-Shift Assay. Synthetic oligonucleotides containing the p53RE of *siah-1b*, either wild type (5'-TCTCAAGACATGTCCAGACC-3') or double mutant (5'-TCTCAAGATATATCCAGACCTCCCCTGATCACATTCAAAGGGTCTCAAGATATATCCAGACC-3') were radiolabeled at their 5' end by using T4 Polynucleotide Kinase (Biolabs) and [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biosciences). The complementary oligonucleotides were then annealed and purified on a polyacrylamide gel. The probes were incubated for 20 min at room temperature with 18 ng of recombinant p53 in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, and 0.5 mg/ml BSA; then 20 ng of DNA competitor poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia) was added to a final volume of 30 μ l. To induce a supershift, 300 ng of p53-specific PAb421 antibody was included in the mixture, and the incubation was continued for 20 min at room temperature. The reaction products were analyzed by electrophoresis on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel.

In Vitro DNase I Footprinting. The radiolabeled forward primer, 5'-CCATGGAGCCACCTCAGCTC-3', and the reverse primer, 5'-ACTAGTAATGAGTTTCCTCCTACATGAA-3', were used in PCR reactions with 25 ng of DNA of the following constructs: *siah-1b*, *siah-1b* mut1, or *siah-1b* mut2. The 410-bp labeled PCR product containing the p53RE in its center was used in DNase-I-footprinting experiments according to the Sure Core Footprinting protocol (Promega) with minor modifications. For each reaction, 500 ng or 1 μ g of p53 or 1 μ g of irrelevant protein were mixed with 500 ng of PAb421 antibody. After 30 min of preincubation on ice, 10 ng (30,000 cpm) of 5' end-labeled DNA was added, and incubation was carried out for another 30 min on ice. After adjusting the concentration to 5 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂, samples were digested with DNase I (0.15 unit) for 1 min at room temperature and resolved on a sequencing gel. DNA-sequencing reactions were done by using the SEQUENASE 2.0 DNA Sequencing Kit (USB).

Chromatin Immunoprecipitation and Western Blot Analysis. Experiments were performed with the chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) according to the manufacturer's instructions. Samples were immunoprecipitated with antibodies against clathrin heavy chain or against p53 (FL-393). PCR analysis of the isolated DNA fragments used the following primer pairs: *siah-1b* forward, 5'-CCATTGTGTGCATCTTCCTGAGCCC-3', and reverse, 5'-GAACTAACCTAGCACTAGTAATGAC-3'; β 2 microglobulin forward, 5'-GCTCTGAAGATTGATTTGAACCTGC-3', and reverse, 5'-ATCCAAGTAATGAGAGTACAGAGG-3'; p21 forward, 5'-CCAGAGGATACCTTGCAAGGC-3', and reverse, 5'-TCTCTGTCTCCATTCATGCTCCTCC-3'. Specificity of the primers was checked by BLAST analysis by using the Ensembl mouse genomic database. PCR reactions with the different primers gave rise to a single specific product of the expected

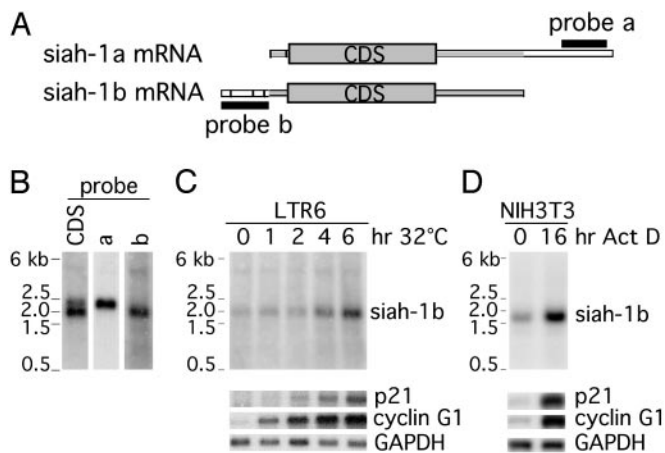


Fig. 1. Activation of p53 induces increased *siah-1b* mRNA levels. (A) Schematic alignment of *siah-1a* and *siah-1b* mRNAs. Exons are represented by bars and the CDSs are represented by large rectangles. Homologous sequences are represented by the gray segments. White segments identify sequences specific to each mRNA. The relative positions of the *siah-1a* and *siah-1b* probes (black bars) used for Northern blot analysis are also indicated. (B) Northern blots of mouse mRNA hybridized with the *siah-1* CDS (probe CDS), the *siah-1a* probe (probe a), or the *siah-1b* probe (probe b). (C) Northern blot analysis of mRNA isolated from LTR6 cells after shifting to 32°C for 1, 2, 4, and 6 h. LTR6 cells at 38°C are used as negative controls. (D) Northern blot analysis of mRNA extracted from NIH 3T3 cells after 16 h of incubation with 15 nM ActD; untreated cells (0 h) were used as control. (C and D) Blots were hybridized with a *siah-1b*-specific probe. p21 and cyclin G1 were used as positive controls for p53 activation. GAPDH was used as control for equal loading.

size. The linear range for each primer pair was determined empirically by using increasing amounts of LTR6 genomic DNA. PCR products were resolved on 2% agarose gels.

Whole-cell extracts were generated by using standard conditions. Extracts containing 20 μ g of total protein were subjected to Western blot analysis by using the FL-393 and B-5-1-2 antibodies.

Results

p53-Dependent Induction of *siah-1b* mRNA. To confirm and extend previous studies showing that *siah-1b* is activated during p53-induced apoptosis, we used the information available in the National Center for Biotechnology Information mRNA database to analyze the sequences of *siah-1a* and *siah-1b*, whose alignment is schematically shown in Fig. 1A. This analysis confirmed that the *siah-1* CDS probe used previously (23) recognizes both *siah-1a* and *siah-1b*. In Northern blot analysis this probe hybridizes to two transcripts of 2.3 and 1.9 kb, respectively (Fig. 1B). To study more specifically *siah-1b* transcription, we designed a probe in the 5' UTR (accession no. Z19580) of its mRNA (nucleotides 1/230) (Fig. 1A). In the same manner we designed a probe specific for *siah-1a* (accession no. Z19579) in the 3' UTR of its mRNA (nucleotides 1676/1934) (Fig. 1A). On mRNA from mouse cells the *siah-1a* probe (probe a) recognizes the 2.3-kb band, whereas the *siah-1b* probe (probe b) recognizes only the 1.9-kb band (Fig. 1B). These results disagree with the suggestion (40) that the band at 2.3 kb includes both *siah-1a* and *siah-1b* transcripts.

According to the published sequences of *siah-1b* mRNA (accession nos. Z19580 and BC052887) the expected size of the *siah-1b* transcript is 1.7 kb. Because our *siah-1b*-specific probe recognizes a band of bigger size, we performed RACE-PCR experiments to determine more precisely the 5' and 3' ends of *siah-1b* mRNA. The 3' RACE-PCR confirmed the published sequences, but the preliminary 5' RACE analysis revealed a

possible alternative splicing of the *siah-1b* first exon. The two different first exons (NM009173 and BC052887) described by Della *et al.* (21) or sequenced by the I.M.A.G.E. Consortium (<http://image.llnl.gov/>), respectively. Each represent 1/7 of the clones analyzed by us. The remaining 5/7 of the clones were found to contain a first exon of 231 bp, which so far has not been described (accession no. AY495086). Transcripts containing this longer exon are expected to have a size of 1.9 kb, confirming the results of our Northern blot analysis.

To confirm that *siah-1b* is activated in the process of p53-induced apoptosis, we used the LTR6 clone derived from M1 mouse myeloid leukemia cells. LTR6 cells are stably transfected with a temperature-sensitive p53 mutant (val135) that gains wild-type function on shifting the temperature from 38 to 32°C, leading cells into programmed cell death (39). As expected, Northern blot analysis confirmed the transcriptional activation of mouse p21 and mouse cyclin G1, both of which are well established p53 target genes, on shift of LTR6 cells to 32°C (Fig. 1C). A parallel, albeit more modest, increase in *siah-1b* mRNA was also observed under the same conditions (Fig. 1C), consistent with the conclusion that *siah-1b* is a p53-inducible gene.

Activated p53 can trigger different effector pathways, depending on cell type and mode of activation. To assess the generality of p53-mediated *siah-1b* induction, we therefore subjected another cell line, NIH 3T3, to treatment with the transcription inhibitor ActD, a well documented activator of the p53 pathway (41, 42). As seen in Fig. 1D, this also resulted in a marked increase in *siah-1b* mRNA.

Identification of a Putative p53 Consensus Site in the *siah-1b* Gene. To determine whether the *siah-1b* gene is a direct transcriptional target of p53, 20 kb of the region of murine chromosome X containing the *siah-1b* locus (nucleotides -18621/+1379 relative to the initiator ATG) were analyzed by using the PATCH software (www.gene-regulation.com/cgi/bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi). A putative p53 consensus binding site was identified in the intronic region comprising nucleotides -2155/-2103, between exons 2 and 3. This DNA element consists of two typical half-sites, 5'-AGACATGTCC-3'. The distance between the two half-sites is unusual: whereas the consensus specifies a spacer of 0-13 bp (33), the two half sites found in *siah-1b* are 33 bp apart. Moreover, from the analysis of many confirmed p53 target sites, it seems that the majority of the physiologically relevant ones have no spacer at all (34, 38). It was therefore of particular interest to test the interaction of p53 with this putative binding site.

Functionality of the p53 Responsive Element in the *siah-1b* Gene. The region nucleotides -2613/-1694 of the *siah-1b* gene, containing the putative p53RE located at nucleotides -2155/-2103, was subcloned into the pGL3-enhancer vector and tested for p53-dependent transcriptional activity in a luciferase assay. The different constructs represented on Fig. 2 Left were transiently transfected into p53-null H1299 lung adenocarcinoma cells with or without a plasmid driving the expression of the mouse p53 protein. Luciferase activity in the presence of p53 was normalized for the activity in the absence of p53 to obtain a fold of activation. The empty luciferase vector (negative control) was not affected by the presence of p53, whereas inclusion of *siah-1b* sequences led to an 8-fold increase in luciferase activity when p53 was present (Fig. 2). To verify that the positive effect of p53 on the transcriptional activity of the reporter plasmid is mediated by the consensus site identified within the *siah-1b* gene, we mutated nucleotides within this site that are known to be necessary for direct binding of p53. Mutation of CATG to TATA in the first half-site (*siah-1b* mut1; Fig. 2) led to a 2-fold reduction in the activating effect of p53, and a similar mutation in the second half-site (*siah-1b* mut2) resulted in a 3-fold reduction. Deletion

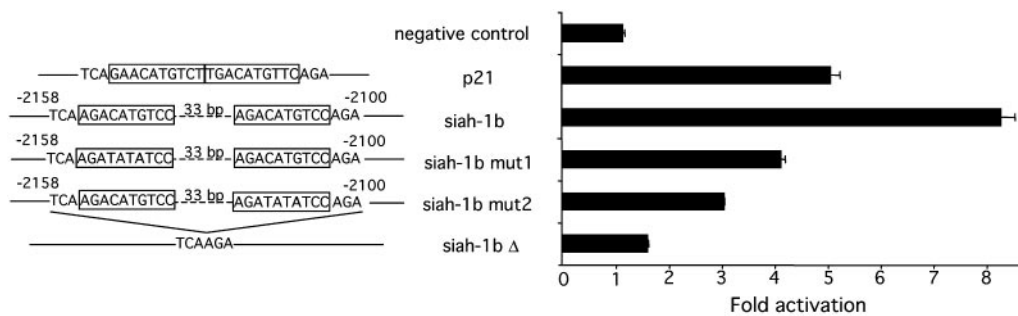


Fig. 2. DNA derived from the *siah-1b* gene confers transcriptional activation by p53. Promoter activity was measured in luciferase assays with reporter plasmids comprising the region nucleotides $-2613/-1694$ of *siah-1b* or its three mutants (*siah-1b* mut1, *siah-1b* mut2, and *siah-1b* Δ) after transient transfection into H1299 cells. (Left) Schematic representation of different constructs. (Right) Corresponding promoter activity of the constructs. A p21 promoter fragment containing the distal p53RE was used as positive control and the empty pGL3 vector was used as negative control. Luciferase activity is reported as fold activation, representing the ratio of the values standardized by protein concentration measured in the presence or absence of p53. Values shown are mean \pm SD ($n = 3$).

of the entire putative p53RE (64 bp; *siah-1b* Δ) abrogated almost completely the effect of p53. Similar results were obtained in mouse NIH 3T3 cells transfected with the same set of reporter plasmids (Fig. 5A, which is published as supporting information on the PNAS web site). Moreover, the extent of activation was p53-dose-dependent (Fig. 5B). These observations imply that p53 responsiveness of the reporter plasmid is indeed due to the presence of the putative intronic p53-binding site identified by us in the *siah-1b* gene.

p53 Binds to the *siah-1b* Promoter *in Vitro*. Electrophoretic mobility-shift assays were used to analyze the binding and affinity of p53 to the p53RE identified in the *siah-1b* gene. A 63-bp radiolabeled probe including this element was incubated with purified baculovirus-derived p53 protein, in the presence of the p53-specific monoclonal antibody Pab421, which stimulates the formation of p53-DNA complexes by imparting a conformational change in p53 (43, 44). As seen in Fig. 3A, such incubation resulted in specific gel retardation (lane 3). A similar effect was seen when *in vitro* translated p53 was used in the reaction (Fig. 6, lane 3, which is published as supporting information on the PNAS web site). The specificity of the binding was verified by competition with an excess of unlabeled DNA containing a p53 consensus site derived from the p21 gene (data not shown). In contrast, no shift was observed when the p53 consensus binding site was mutated (*siah-1b* mut3, Fig. 3A, lanes 6 and 7). Comparison with the positions of molecular weight markers run on the same gel suggests that the supershifting complex has an approximate size of 850 kDa, corresponding to a p53 tetramer plus four antibody molecules and the probe (45). Thus, despite the nonconventional nature of the consensus sequence, the mode of binding of p53 appears to be similar to that occurring with more typical p53-binding sites.

The use of short double-stranded oligonucleotide probes for p53 bandshift assays has been questioned (46). Therefore, we also performed DNase-I-footprinting studies by using a 410-bp labeled probe corresponding to nucleotides $-2290/-1880$ of the *siah-1b* gene, centered around the p53RE. As shown in Fig. 3B, p53 protected the two half-sites from DNase I cleavage but did not protect the spacer DNA between the two half-sites. The latter may be because of the relatively long distance between the two half-sites. A similar footprint was obtained in the absence of antibody (data not shown). Remarkably, mutation of either of the two half-sites from CATG to TATA abrogated p53-mediated protection of that particular half-site, but not affecting the protection of the other one, whose sequence remained wild type (Fig. 3B, lanes 4, 5, and 6 marked for *siah-1b* mut1 and lanes 7, 8, and 9 marked for *siah-1b* mut2). These results demonstrate that p53 can bind to either one or both of the consensus half-sites

found in the *siah-1b* gene. In conclusion, electrophoretic mobility-shift assay and DNase I footprinting demonstrate that p53 is able to associate *in vitro* with the p53 consensus located at nucleotides $-2155/-2112$ of the *siah-1b* gene.

p53 Associates with *siah-1b* Chromatin *in Vivo*. To determine whether p53 could bind the intronic *siah-1b* p53RE *in vivo*, we performed ChIP experiments. The LTR6 cell system was used for this purpose, under the same conditions where endogenous *siah-1b* transcription is efficiently activated by p53 (see Fig. 1C). M1 and LTR6 cells were maintained at 38°C or 32°C for 6 h and treated with formaldehyde to generate covalently cross-linked DNA-protein complexes within the cells. Cross-linked chromatin was then immunoprecipitated with antibodies against clathrin heavy chain for negative control or against p53. PCR amplification was then performed on the immunoprecipitated DNA and on total input DNA after fragmentation (input). Primers specific for *siah-1b*, corresponding to positions $-2208/-2184$ (forward) and $-1891/-1967$ (reverse) were designed in the genomic sequence containing the p53RE, thus avoiding cross-reactivity with the other *siah* homologues. As seen in Fig. 4A, *siah-1b* and p21 chromatin were specifically immunoprecipitated with anti-p53 antibodies only from LTR6 cells maintained at 32°C; hence, like the corresponding elements in the p21 gene promoter, the p53RE within the *siah-1b* intron is indeed occupied by wild-type p53 within living cells.

To rule out the possibility that the *in vivo* binding of p53 to the *siah-1b* genomic DNA was due to a p53 overexpression artefact, we induced activation of endogenous p53 in NIH 3T3 cells by treatment with ActD, which led to a substantial increase in the steady-state levels of p53 (Fig. 4B). When such ActD-treated NIH 3T3 cells were used as the starting material for ChIP analysis, a clear association was observed between p53 and *siah-1b* chromatin and with p21 chromatin (Fig. 4C). p53 binding to the *siah-1b* chromatin remained maximal after 24 h of ActD treatment, whereas binding to the p21 promoter region decreased between 16 and 24 h of treatment. Thus, both transfected and endogenous p53 are found specifically associated with the *siah-1b* gene *in vivo*, further confirming that this is a bona fide direct p53 target gene.

Discussion

In the present study we show that the mouse *siah-1b* gene, shown previously to be up-regulated during p53-mediated apoptosis (24), contains a functional p53RE within its second intron. This p53RE enables the transactivation of the *siah-1b* gene by p53 in response to anticancer agents such as ActD. Through the use of suitable molecular tools, which discern between the different highly homologous mouse *siah-1* transcripts, we show that

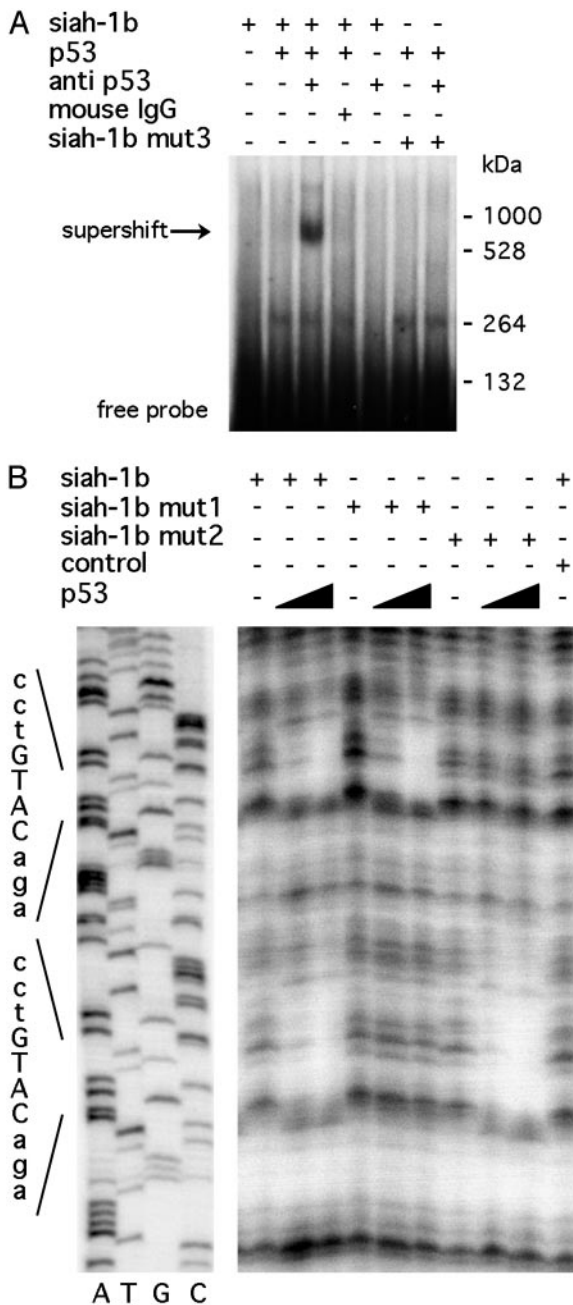


Fig. 3. p53 binds to the *siah-1b* promoter *in vitro*. (A) Electrophoretic mobility-shift assay was performed with a probe corresponding to the p53RE of the *siah-1b* promoter (nucleotides -2160/-2098). This probe was incubated with recombinant p53 protein (lanes 2, 3, 4, 6, and 7) in the absence (lanes 1, 2, 4, and 6) or in the presence (lanes 3, 5, and 7) of the PAb421 antibody. In lanes 6 and 7, the probe contained a double mutation in the p53 consensus site (*siah-1b* mut3). A pool of mouse IgGs was used as control for the PAb421 antibody specificity (lane 4). (B) *In vitro* DNase-I-footprinting experiment with labeled probes designed to have the p53RE placed in their center. Probes containing the p53RE of *siah-1b* (lanes 1-3) or its mutants (lanes 4-6 for *siah-1b* mut1 and lanes 7-9 for *siah-1b* mut2) were incubated with either 0.5 (lanes 2, 5, and 8) or 1 μ g of purified p53 (lanes 3, 6, and 9) or with an irrelevant protein (lane 10) before digestion with DNase I. The positions of the p53-binding sites were identified by running DNA-sequencing reactions next to the footprinting experiment (Left).

siah-1b mRNA is increased as a result of p53 activation, thus resolving previous ambiguities stemming from the use of non-specific probes (12, 16, 21, 24, 40).

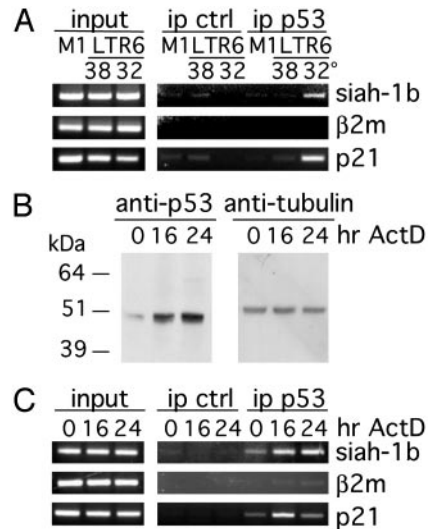


Fig. 4. p53 binds to *siah-1b* chromatin *in vivo*. ChIP was performed after p53 activation *in vivo* with antibodies against clathrin heavy chain (ip ctrl) or p53 (ip p53). PCR was performed with gene-specific primers. Total lysate was used as a control for PCR amplification (input). p53 binding was tested by using *siah-1b*-specific primers; p21 primers and β 2 microglobulin primers were used as positive and negative controls, respectively. (A) Results of ChIP analysis done on LTR6 cells, activated by temperature shift to 32°C for 6 h. M1 and LTR6 cells maintained at 38°C served as negative controls. (B) Western blot analysis of p53 in NIH 3T3 cells activated with 15 nM ActD for 16 or 24 h. Untreated cells were used as negative control (0 h). α -Tubulin served as an equal loading control. (C) Results of ChIP analysis done on NIH 3T3 cells treated as in B.

Basal levels of *siah-1b* mRNA are also present before p53 activation, suggesting that the protein has a role in nonstressed cells. Moreover, *siah-1b* expression can be induced by p53-independent mechanisms (13), although expression is maximal when p53 is activated.

A recent report, with *siah-1b*-null mouse embryo fibroblasts, has concluded that *Siah-1b* is not involved in the p53 pathway (40). However, it is possible that in such cells p53 activates multiple downstream effectors. The role of *Siah-1b* could thus be substituted by proteins encoded by one or more of the other p53-responsive genes that are transactivated simultaneously with *siah-1b*. Moreover, the apparent discrepancy between our data and those of Bowtell and coworkers (40) may also be due to different experimental conditions; it is conceivable that the contribution of *Siah-1b* to the p53 response may vary as a function of the cellular context. In this regard, it is noteworthy that the effect of p53 itself is also greatly cell-context-dependent; thus, activation of the same temperature-sensitive p53 mutant can induce growth arrest, apoptosis, or differentiation in a context-dependent manner (47).

The pattern and extent of induction of different p53 target genes greatly depends on the concentration of active p53 protein within a given cell (48). In this regard, it is of note that the *siah-1b* gene seems to require higher levels of p53 activity for maximum activation than the p21 gene (Fig. 1C), and this requirement is also seen when the corresponding p53REs are compared in luciferase assays (see Fig. 5B). This finding is most likely because of differences in the affinity of p53 for the corresponding p53REs, as seen also with other p53 target genes (49). This difference of affinity is also suggested by the fact that although for p21 10 min of crosslinking were sufficient to obtain an optimal PCR signal in the ChIP analysis, 15 min were required for *siah-1b* (data not shown).

The identified p53RE is functional, despite its unusual structure. So far, no functional p53RE with such a long spacer

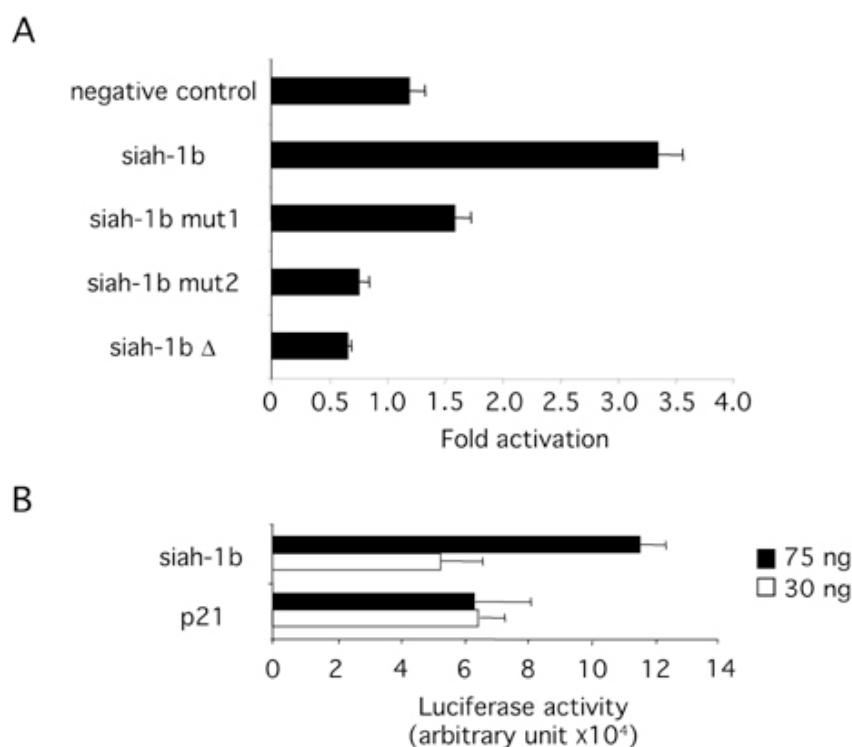
between the two half-sites has been described. It is possible that the sequence of the spacer also has a role in enabling such an unusual p53RE to function properly. The footprinting analysis suggests that the spacer is not directly involved in interactions with p53; nevertheless, this region may be recognized *in vivo* by other proteins required for optimal p53-induced transcription of *siah-1b*. Also, each of the two half-sites seems to function even on its own, when the other half-site is mutant and incapable of binding p53; this independent functioning is seen both in DNA-binding analysis (Fig. 3B) and in functional assays (Fig. 2). Several studies have proposed a role for the Siah proteins in p53-mediated responses (11, 13, 19, 50–52). It is also noteworthy that *siah-1b* knockout mice are not viable, emphasizing the

importance of this gene in embryonic development. The exact way in which Siah contributes to p53-mediated apoptosis or cell cycle arrest is still not clearly defined; one possibility is that Siah's contribution may have to do with the proposed role of Siah-1 in mediating p53-dependent degradation of β -catenin in response to DNA damage (51). By establishing a direct link between p53 and transcriptional regulation of the *siah-1b* gene, our study further supports the importance of the latter in the p53 response.

We thank Pierre Chambon (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) for his advice and support. This work was supported in part by European Commission Grant QLK6-CT-2000-00159.

- Carthew, R. W. & Rubin, G. M. (1990) *Cell* **63**, 561–577.
- Li, S. C., Songyang, Z., Vincent, S. J., Zwahlen, C., Wiley, S., Cantley, L., Kay, L. E., Forman-Kay, J. & Pawson, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7204–7209.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Kwan, E. & Rubin, G. M. (1997) *Cell* **90**, 459–467.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. & Weissman, A. M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11364–11369.
- Germani, A., Bruzzoni-Giovanelli, H., Fellous, A., Gisselbrecht, S., Varin-Blank, N. & Calvo, F. (2000) *Oncogene* **19**, 5997–6006.
- Tiedt, R., Bartholdy, B. A., Matthias, G., Newell, J. W. & Matthias, P. (2001) *EMBO J.* **20**, 4143–4152.
- Wheeler, T. C., Chin, L. S., Li, Y., Roudabush, F. L. & Li, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 10273–10282.
- Nagano, Y., Yamashita, H., Takahashi, T., Kishida, S., Nakamura, T., Iseki, E., Hattori, N., Mizuno, Y., Kikuchi, A. & Matsumoto, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 51504–51514.
- Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Monroe, D. G., Janknecht, R. & Spelsberg, T. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 30754–30759.
- Habelhah, H., Frew, I. J., Laine, A., Janes, P. W., Relaix, F., Sassoon, D., Bowtell, D. D. & Ronai, Z. (2002) *EMBO J.* **21**, 5756–5765.
- Susini, L., Passer, B. J., Amzallag-Elbaz, N., Juven-Gershon, T., Prieur, S., Privat, N., Tuynder, M., Gendron, M. C., Israel, A., Amson, R., *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15067–15072.
- Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J. P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9039–9042.
- Roperch, J. P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pasturaud, P., Gendron, M. C., Dausset, J., *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8070–8073.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. & Telerman, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14976–14981.
- Bruzzoni-Giovanelli, H., Faille, A., Linares-Cruz, G., Nemani, M., Le Deist, F., Germani, A., Chassoux, D., Millot, G., Roperch, J. P., Amson, R., *et al.* (1999) *Oncogene* **18**, 7101–7109.
- Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Alvaro, V., Roperch, J. P., Tuynder, M., Schoevaert, D., Nemani, M., Prieur, S., Lethrosne, F., Piouffre, L., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1131–1135.
- Matsuzawa, S. I. & Reed, J. C. (2001) *Mol. Cell* **7**, 915–926.
- Matsuzawa, S., Li, C., Ni, C. Z., Takayama, S., Reed, J. C. & Ely, K. R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1837–1840.
- Relaix, F., Wei, X., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D. D., Sassoon, D. A. & Wu, X. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2105–2110.
- Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B. A., Zapata, J. M. & Reed, J. C. (1998) *EMBO J.* **17**, 2736–2747.
- Della, N. G., Senior, P. V. & Bowtell, D. D. (1993) *Development (Cambridge, U.K.)* **117**, 1333–1343.
- Weston, K. (1998) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 76–81.
- Dickins, R. A., Frew, I. J., House, C. M., O'Bryan, M. K., Holloway, A. J., Haviv, I., Traficante, N., de Kretser, D. M. & Bowtell, D. D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2294–2303.
- Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J. P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3953–3957.
- Yoon, H., Liyanarachchi, S., Wright, F. A., Davuluri, R., Lockman, J. C., de la Chapelle, A. & Pellegata, N. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15632–15637.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**, 817–825.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J. (1993) *Genes Dev.* **7**, 1126–1132.
- Okamoto, K. & Beach, D. (1994) *EMBO J.* **13**, 4816–4822.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Reed, J. C. (1994) *Oncogene* **9**, 1799–1805.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) *Science* **288**, 1053–1058.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2001) *Mol. Cell* **7**, 673–682.
- Passer, B. J., Nancy-Portebois, V., Amzallag, N., Prieur, S., Cans, C., Roborel De Climens, A., Fiucci, G., Bouvard, V., Tuynder, M., Susini, L., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2284–2289.
- el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1992) *Nat. Genet.* **1**, 45–49.
- Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Waldman, T., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1994) *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1537–1542.
- Wang, Y., Farmer, G., Soussi, T. & Prives, C. (1995) *Oncogene* **10**, 779–784.
- Waterman, J. L., Shenk, J. L. & Halazonetis, T. D. (1995) *EMBO J.* **14**, 512–519.
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E. & Shay, J. W. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2866–2871.
- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A. J. & Ott, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8467–8472.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. & Oren, M. (1991) *Nature* **352**, 345–347.
- Frew, I. J., Dickins, R. A., Cuddihy, A. R., Del Rosario, M., Reinhard, C., O'Connell, M. J. & Bowtell, D. D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8155–8164.
- Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M. & Wasylyk, B. (1996) *EMBO J.* **15**, 1615–1624.
- Andera, L. & Wasylyk, B. (1997) *Mol. Med.* **3**, 852–863.
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A. & Lane, D. P. (1992) *Cell* **71**, 875–886.
- Halazonetis, T. D., Davis, L. J. & Kandil, A. N. (1993) *EMBO J.* **12**, 1021–1028.
- Nagaich, A. K., Zhurkin, V. B., Sakamoto, H., Gorin, A. A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Appella, E. & Harrington, R. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14830–14841.
- McKinney, K. & Prives, C. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6797–6808.
- Lo, P. K., Chen, J. Y., Tang, P. P., Lin, J., Lin, C. H., Su, L. T., Wu, C. H., Chen, T. L., Yang, Y. & Wang, F. F. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 37186–37193.
- Inga, A., Storici, F., Darden, T. A. & Resnick, M. A. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8612–8625.
- Szak, S. T., Mays, D. & Pietenpol, J. A. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3375–3386.
- Hu, G., Chung, Y. L., Glover, T., Valentine, V., Look, A. T. & Fearon, E. R. (1997) *Genomics* **46**, 103–111.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L. & Matsunami, N. (2001) *Mol. Cell* **7**, 927–936.
- Maeda, A., Yoshida, T., Kusuzaki, K. & Sakai, T. (2002) *FEBS Lett.* **512**, 223–226.

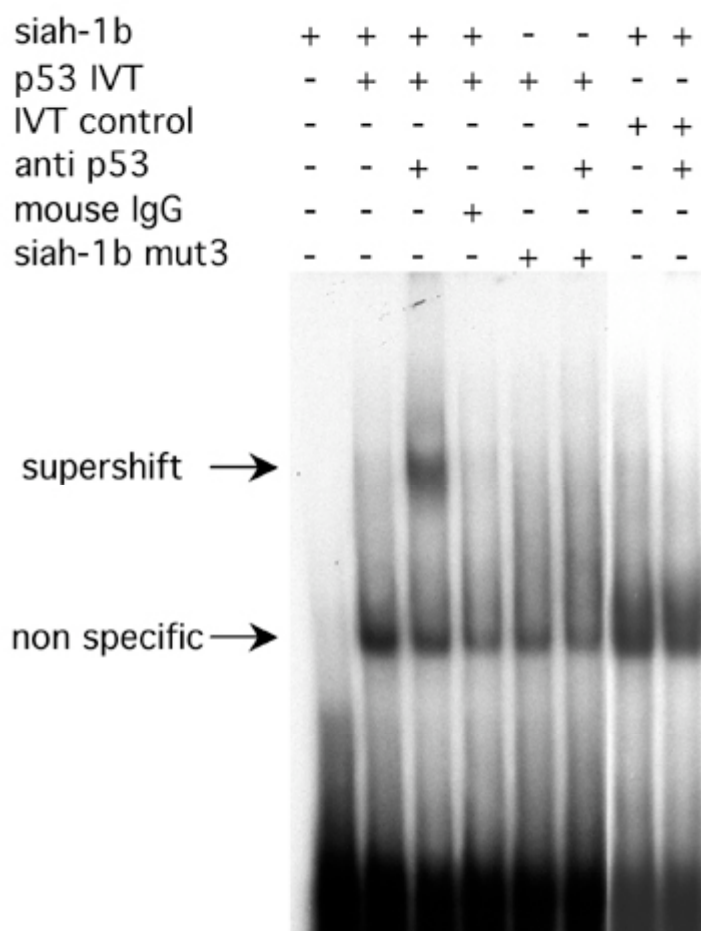
Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 5.

Transcriptional activation of siah-1b by p53 in NIH 3T3. To confirm the results obtained in the H1299 human cell line, we performed luciferase assay in another cellular environment. (A) Luciferase activity of the fragment nucleotides -2613/-1694 of the siah-1b promoter and of the three mutants (siah-1b mut1, siah-1b mut2, and siah-1b Δ) in NIH 3T3 cells. Empty pGL3 vector is used as negative control. The activity is reported as fold of activation, representing the ratio of the values, standardized by protein concentration and measured in the presence or absence of p53. (B) Promoter activity of siah-1b and p21 was performed in luciferase assay with 75 or 30 ng of the p53 pCMV construct transiently transfected in NIH 3T3 cells. Luciferase expression is represented in arbitrary units. Data are calculated on the mean values with \pm SD ($n = 3$).

Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 6.

p53 binds to the siah-1b promoter in vitro. To confirm the results obtained with the baculovirus-produced p53, we tested in gel-shift assay the p53 protein produced by in vitro transcription translation (IVT). Electrophoretic mobility-shift assay was performed with a probe containing the p53 responsive element of the siah-1b promoter (nucleotides-2160/-2098) (lanes 1-4, 7, and 8). This probe was incubated with the p53 produced by IVT (lanes 2-6) in the absence (lanes 1, 2, 4, 5, and 7) or in the presence (lanes 3, 6, and 8) of the PAb421 antibody. The effect of the double mutation in the p53 consensus sites (siah-1b mut3) is shown in lanes 5 and 6. To verify that no protein of the IVT reaction mix is involved, we tested the reticulocyte lysate alone (IVT control, lanes 7 and 8). A pool of mouse IgGs was used as control of the antibody specificity (lane 4). The supershift and a nonspecific gel retardation observed without p53 (IVT control) are indicated by arrows.

Annexe 3**The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase.**

Brent J. Passer*†, Vanessa Nancy-Portebois*†, Nathalie Amzallag*†, Sylvie Prieur*,
Christophe Cans*, Aude Roborel de Climens*, Giusy Fiucci*, Véronique Bouvard*,
Marcel Tuynder*, Laurent Susini*, Stephanie Morchoisne*, Virginie Crible*,
Alexandra Lespagnol*, Jean Dausset‡, Moshe Oren§,
Robert Amson*, and Adam Telerman*¶

Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.
Volume 100, Number 5, pages 2284-2289, March 4 2003.

**Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; ‡Fondation Jean Dausset–Centre d’Etude du Polymorphisme Humain, 27 Rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France; and §Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel*

The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase

Brent J. Passer*[†], Vanessa Nancy-Portebois*[†], Nathalie Amzallag*[†], Sylvie Prieur*, Christophe Cans*, Aude Roborel de Climens*, Giusy Fiucci*, Véronique Bouvard*, Marcel Tuynder*, Laurent Susini*, Stéphanie Morchoisne*, Virginie Crible*, Alexandra Lespagnol*, Jean Dausset*, Moshe Oren[§], Robert Amson*, and Adam Telerman*[¶]

*Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; [†]Fondation Jean Dausset–Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, 27 Rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France; and [§]Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

Contributed by Jean Dausset, January 16, 2003

The p53 tumor suppressor protein plays a crucial role in tumorigenesis by controlling cell-cycle progression and apoptosis. We have previously described a transcript designated tumor suppressor activated pathway-6 (TSAP6) that is up-regulated in the p53-inducible cell line, LTR6. Cloning of the murine and human full-length TSAP6 cDNA revealed that it encodes a 488-aa protein with five to six transmembrane domains. This gene is the murine and human homologue of the recently published rat pHyde. Antibodies raised against murine and human TSAP6 recognize a 50- to 55-kDa band induced by p53. Analysis of the TSAP6 promoter identified a functional p53-responsive element. Functional studies demonstrated that TSAP6 antisense cDNA diminished levels of the 50- to 55-kDa protein and decreased significantly the levels of p53-induced apoptosis. Furthermore, TSAP6 small interfering RNA inhibited apoptosis in TSAP6-overexpressing cells. Yeast two-hybrid analysis followed by GST/*in vitro*-transcribed/translated pull-down assays and *in vivo* coimmunoprecipitations revealed that TSAP6 associated with Nix, a proapoptotic Bcl-2-related protein and the Myt1 kinase, a negative regulator of the G₂/M transition. Moreover, TSAP6 enhanced the susceptibility of cells to apoptosis and cooperated with Nix to exacerbate this effect. Cell-cycle studies indicated that TSAP6 could augment Myt1 activity. Overall, these data suggest that TSAP6 may act downstream to p53 to interface apoptosis and cell-cycle progression.

A series of 10 differentially expressed genes designated as either tumor suppressor activated pathway (TSAP) or tumor suppressor inhibited pathway (TSIP) have been described that were either up- or down-regulated, respectively, by p53 activation in LTR6 cells (1). LTR6 cells are derivatives of the murine myeloid M1 cell line carrying the Val-135 temperature-sensitive p53 mutant (2). After shifting to 32°C, LTR6 cells acquire wild-type p53 function and subsequently undergo massive apoptosis (2). Among the isolated genes characterized subsequently are Siah1b (TSAP3) and presenilin-1 (TSIP2) (1). Siah1b is the mammalian homologue of the *Drosophila* seven in absentia gene, Sina (3, 4). Presenilin-1, a predisposition gene for familial Alzheimer's disease (5), is inhibited by p53 activation and functions as an antiapoptotic molecule (6). TSAP6 represents a molecule up-regulated by p53. Recently it was reported that pHyde, the rat homologue of TSAP6, could induce apoptosis in a caspase-dependent manner in prostate cancer cells (7, 8).

The p53 tumor suppressor protein functions to maintain genomic integrity. It prevents the proliferation of cancer-prone cells primarily by enlisting two biological processes: cell-cycle arrest and apoptosis (9, 10). The proapoptotic effects of p53 are mediated by a variety of mechanisms (9, 11–13). Part of the cell-cycle regulatory function of p53 involves the induction of p21^{waf-1} (14, 15), an inhibitor of cyclin-dependent kinases, which inhibits cell-cycle progression at both G₁ and G₂ (16–18). p53

also blocks cells at the G₂/M checkpoint by inhibiting the function of p34^{cdc2}, the cyclin-dependent kinase required for entry into mitosis. The enzymatic activity of p34^{cdc2} is subjected to negative regulation by the Wee1 kinase, which phosphorylates p34^{cdc2} on Tyr-15 (19), and Myt1, a dual-specificity kinase, that phosphorylates p34^{cdc2} on both Thr-14 and Tyr-15 residues (20, 21).

In the present study we characterize TSAP6. TSAP6 is transcriptionally activated by p53, whereas its gene product associates with Myt1 and Nix proteins. Elevation of TSAP6 expression augments cell-cycle delay and apoptosis, suggesting that TSAP6 might play a pivotal role in tumor suppression.

Materials and Methods

TSAP6 cDNA and Promoter Cloning. To obtain the murine TSAP6 full-length cDNA, an antisense primer (5'-GTGAGTACATATCACATGTATGGGGTGTCA-3', GenBank accession no. U50961) was designed for 5' rapid amplification of cDNA ends on a murine liver Marathon cDNA library (CLONTECH). Human TSAP6 full-length cDNA was cloned from a human pooled-tissue cDNA (CLONTECH). Nonoverlapping fragments covering ≈20,700 bp on chromosome 1 upstream of the first exon of mouse TSAP6 were cloned from DNA derived from mouse embryonic stem cells.

Antibodies and Cells. Anti-TSAP6 S15N antibody was raised against a peptide derived from the sequence of murine TSAP6 SNPTEKEHLQHRQSN. Anti-TSAP6a was generated against amino acids 16–30 (DSDSSLAKVPDEAPK) of the human TSAP6 protein. The anti-Myt1 (3027) antibody (22) and anti-Nix (Abcam, Cambridge, U.K.) were used for immunoblotting. LTR6-as2 and LTR6-as4 are two polyclonal LTR6 cell lines stably transfected with pBK-RSV (Promega) containing murine TSAP6 antisense. The HeLa-39 and HeLa-51 monoclonal cell lines stably express hemagglutinin (HA)-TSAP6 and were selected with G418. HA-TSAP6-inducible HeLa cells (Invitrogen) were grown in the presence of blasticidin (5 μg/ml) and hygromycin (150 μg/ml). Doxycycline (ICN) was added at the indicated times to induce HA-TSAP6 expression.

Yeast Two-Hybrid (Y2H) Screen. Full-length human TSAP6 was fused in frame with the LexA DNA-binding domain of pEG202.

Abbreviations: TSAP, tumor suppressor activated pathway; HA, hemagglutinin; Y2H, yeast two-hybrid; IVT, *in vitro*-transcribed/translated; siRNA, small interfering RNA; DTB, double-thymidine block; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; AIP, apoptosis-linked gene-2-interacting protein 1.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database [accession nos. AY214462 (murine TSAP6) and AY214461 (human TSAP6)].

[†]B.J.P., V.N.-P., and N.A. contributed equally to this work.

[¶]To whom correspondence should be addressed. E-mail: atelerman@molecular-engines.com.

A cDNA library ($\approx 10^6$) derived from the murine LTR6 cell line, incubated at 32°C for 4 h, was cloned into the galactose-inducible pYESTrp2 vector (Invitrogen). Y2H screening was performed as described (23).

Protein-Interaction Assays. GST/*in vitro*-transcribed/translated (IVT) and 293T cell transfection interaction analysis were performed by using standard procedures. For detection of endogenous interactions, U2OS, HeLa-39, K562, and human fetal tissue-derived lysates were immunoprecipitated with anti-TSAP6 antibody or an IgY-negative control and immunoblotted with either anti-Nix or anti-Myt1 antibody.

Apoptotic and TSAP6 Small Interfering RNA (siRNA) Studies. Cell death was assessed by either measuring the DNA content of isolated nuclei stained with propidium iodide or staining cells with annexin V-phycoerythrin (Roche, Indianapolis). For siRNA experiments, TSAP6 mRNA was knocked down with small interfering RNA molecules (24). RNA duplex with 3'-dTdT overhang directed against TSAP6 5'-AAGATCCTGGTGGATGTGAGC-3' was synthesized (Dharmacon, Lafayette, CO). Mouse *Trt* siRNA duplex 5'-AACCATCACTACAA-GAAACC-3' was used as control.

Northern Blot Analysis and Luciferase Assays. Northern blot analysis was carried out by using 3 μ g of poly(A)⁺ mRNA. For luciferase assays, 293T cells were transfected by using Lipofectamine (GIBCO/BRL) with 0.8 μ g of the indicated TSAP6-Luc constructs together with 0.8 μ g of either pCMVc5-p53 or vector control.

Cell-Synchronization Studies. HeLa cells were synchronized at the G₁/S border by double-thymidine block (DTB) as described (25).

Results

TSAP6 Is a Putative Multipass Membrane Protein. Full-length human and murine TSAP6 cDNA were cloned. The deduced amino acid sequence predicts that both proteins are of 488 aa, sharing 87% identity (Fig. 1A). TSAP6 is predicted to have five to six transmembrane-spanning regions. An iterative PSI-BLAST search revealed a GXGXXG/A motif, also known as Rossmann fold (26), within the NH₂-terminal cytoplasmic portion of TSAP6, a domain prevalent in molecules containing oxidoreductase and dehydrogenase activities. BLAST search analysis revealed that TSAP6 is homologous to the previously reported pHyde (GenBank accession no. AF238864) and dudulin-2 (GenBank accession no. NM.018234). Furthermore, TSAP6 displays significant homology with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP), a molecule overexpressed in prostate cancer cells (27), and TIARP, tumor necrosis factor- α -induced adipose-related protein, implicated in adipocyte differentiation (28).

Northern blot analysis on human (Fig. 1B Left) and murine (Fig. 1B Right) multitissue blots revealed differentially expressed TSAP6 transcripts of 4.3 and 3.8 kb, respectively. Last, fluorescence *in situ* hybridization localized TSAP6 to human chromosome 2q14.2 (data not shown).

The protein-expression pattern of TSAP6 was also assessed. The anti-murine TSAP6 (S15N) antibody recognized an ≈ 50 - to 55-kDa species in cell extracts derived from LTR6 cells, the amount of which increased when wild-type p53 function was activated at 32°C (Fig. 1C Left). Overexpression of human HA-TSAP6 by IVT, stable expression in HeLa cells (HeLa-39), or induced expression after doxycycline treatment of HeLa Tet-on cells resulted in the appearance of a doublet in the 50- to 55-kDa region (Fig. 1C Right). Furthermore, anti-human TSAP6 (TSAP6a) immunoprecipitated overexpressed HA-TSAP6 (Fig. 1C Right, lane 4).

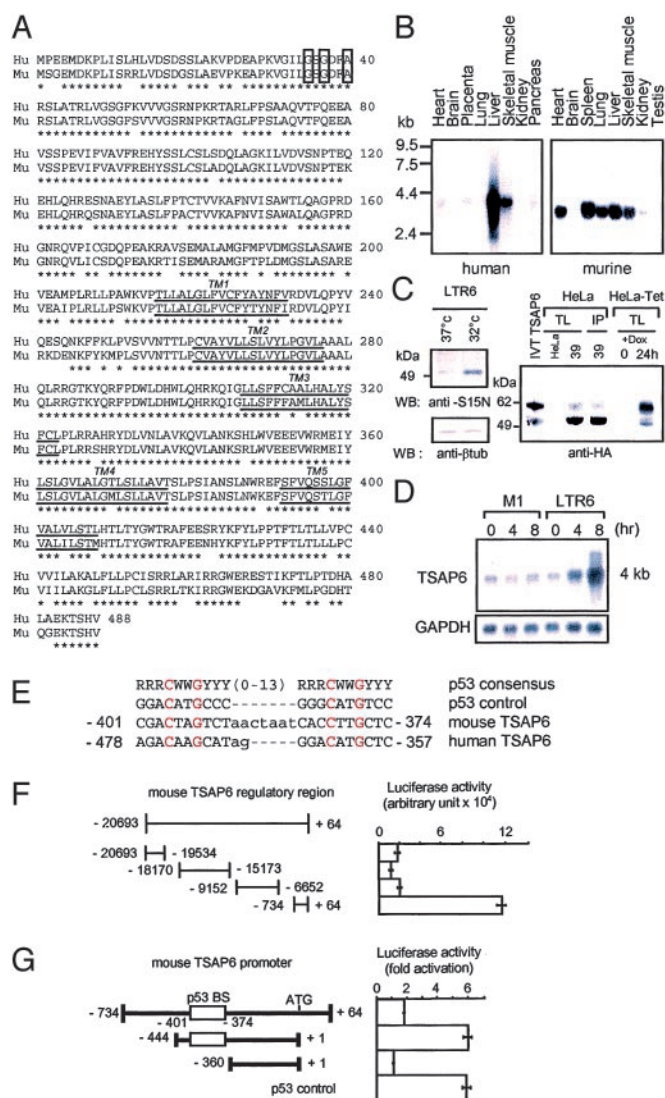


Fig. 1. TSAP6 encodes a putative five- to six-transmembrane protein that is transactivated by p53. (A) Amino acid sequence comparison of human (Hu) and murine (Mu) TSAP6. The five-transmembrane regions (TM1–5) are underlined. The conserved Rossmann-fold motif is boxed in bold. *, amino acid identities between human and mouse TSAP6. (B) Multitissue Northern blots probed with either human (Left) or murine (Right) TSAP6. (C) Anti-murine TSAP6 (S15N) Western blot analysis of extracts from LTR6 cells either before (lane 1) or after (lane 2) temperature shift to 32°C to induce p53 activity. Anti-HA immunoblot detects a doublet of ≈ 50 and 55 kDa from nonradiolabeled IVT TSAP6-HA, HeLa-39 lysates, and HeLa-Tet cells 24 h after the addition of doxycycline. Anti-TSAP6a immunoprecipitated (IP) the same species (Right, lane 4). (D) Northern blot analysis of TSAP6 expression levels in LTR6 cells compared with its parental p53 null cell line, M1, before and after temperature shift. (E) Sequences of the potential p53 response elements within the mouse and human TSAP6 promoters aligned with the consensus p53-binding site (14) (where R indicates purine, Y indicates pyrimidine, and W indicates A or T). Also shown is the sequence of a consensus p53-binding site (p53 control) used as a positive control in G. (F) The indicated fragments of the mouse TSAP6 promoter were transfected either alone or together with pCMVc50-p53 and tested in luciferase assays. Numbers represent arbitrary units. (G) TSAP6 promoter sequences containing the predicted p53-binding site (p53 BS) are transactivated by p53. Luciferase activity is shown as fold activation. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$).

TSAP6 Transcripts Are Up-Regulated by p53. Northern blot analysis confirmed the up-regulation of TSAP6 4–8 h after p53 activation in LTR6 cells (Fig. 1D) and in MCF7 cells after actinomycin

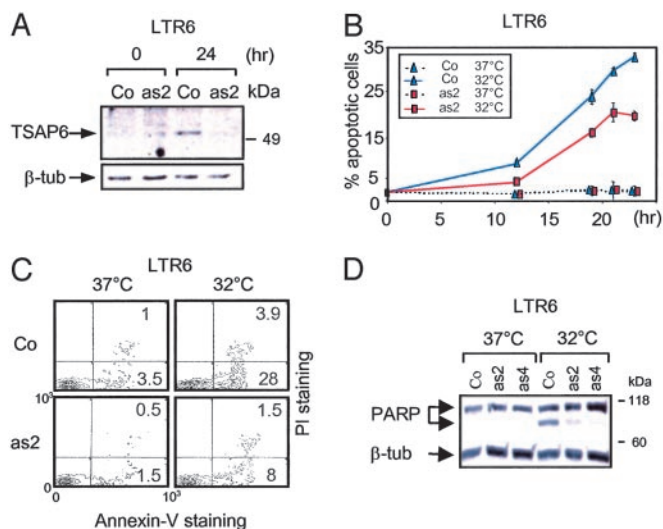


Fig. 2. TSAP6 antisense impairs p53-induced apoptosis. LTR6-control (Co) or LTR6-TSAP6 antisense (-as2 and -as4) cells were cultured at 32°C to activate p53. At the indicated time points, cells were harvested and assayed for apoptosis. (A) TSAP6 protein levels in LTR6-as2 cells are diminished 24 h after p53 activation as detected by immunoblotting with the S15N anti-TSAP6 antibody. β-tub, β-tubulin. (B and C) Apoptosis was measured by flow cytometry by either determining the percentage of nuclei undergoing DNA fragmentation (B) or annexin V staining (C). The percentage of cell death represents the mean of three independent experiments. LTR6 (Co) represents LTR6 cells with or without vector. PI, propidium iodide. (D) Reduced PARP cleavage in LTR6-as2 and -as4 cells after p53 activation. Total lysates were generated and analyzed by immunoblotting with an anti-PARP antibody.

treatment, which activates the endogenous p53 protein (see Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site, www.pnas.org). Luciferase assays were performed in 293T cells to monitor transactivation of the TSAP6 promoter by p53. To that end, four nonoverlapping fragments covering ≈20 kb of the first exon of the murine TSAP6 promoter were cloned in front of the luciferase reporter gene (TSAP6-Luc). The proximal -734 +64 sequence contains a putative p53-binding site, the sequence of which can be aligned with a typical p53 consensus site and appears to be conserved with its human counterpart (Fig. 1E). Luciferase assays showed strong induction of -734 +64 TSAP6-Luc by p53 (Fig. 1F). Further mapping showed that fragments containing the p53-binding site retained transactivation by p53, whereas -360 +1 TSAP6-Luc, lacking this p53-binding site, was unresponsive (Fig. 1G). Overall, these data argue that TSAP6 can be transcriptionally activated by p53.

TSAP6 Antisense Dampens p53-Induced Apoptosis. To investigate a possible role of TSAP6 in p53-mediated apoptosis, LTR6 cells carrying either vector control or TSAP6 antisense (-as2 and -as4) were generated. Immunoblot analysis confirmed that by 24 h after p53 activation, endogenous TSAP6 expression was partially compromised in LTR6-as2 compared with their parental LTR6 cells (Fig. 2A). DNA fragmentation analysis by flow cytometry revealed that by 19 and 23 h after p53 activation, LTR6-as2 exhibited a significant reduction in cell death of ≈35% and ≈41%, respectively, as compared with LTR6 control cells (Fig. 2B). A similar conclusion was reached by annexin V staining. Two-color flow-cytometry analysis revealed that by 18 h after p53 activation, 28% of LTR6 cells became annexin V⁺ as compared with only 8% of LTR6-as2 cells (Fig. 2C). In addition, cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), another indicator of apoptosis, was notably diminished 18 h after p53

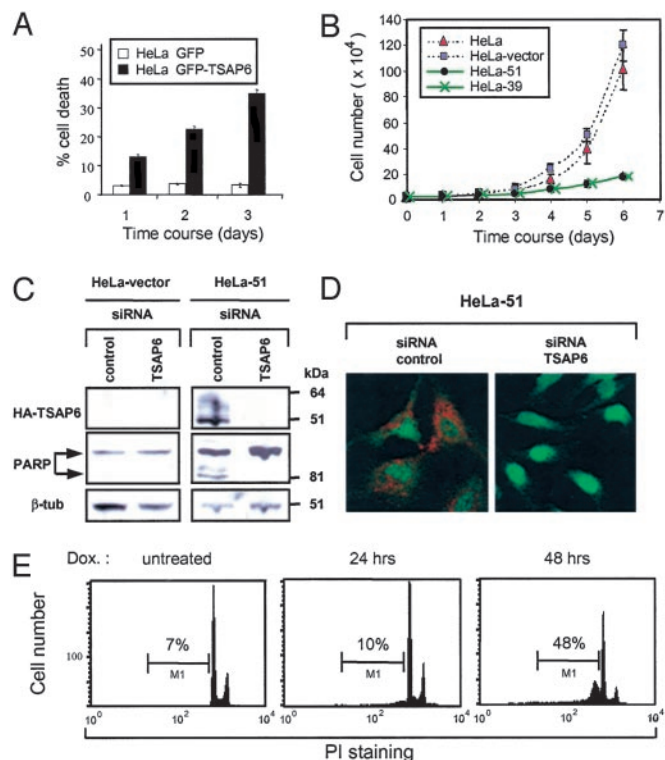


Fig. 3. TSAP6 sensitizes cells toward apoptosis. (A) Transient expression of GFP-TSAP6 in HeLa cells promotes apoptosis. Plasmids expressing GFP or GFP-TSAP6 were transfected into HeLa cells. GFP⁺ cells were scored for apoptosis by monitoring nuclear shrinkage. (B) HeLa and HeLa-vector control cells were analyzed in parallel with HeLa-39 and HeLa-51 clones for cell growth. At the indicated time points, cells were harvested and counted. Experiments were performed in triplicate (mean ± SD). (C) HeLa-vector (Left) and HeLa-51 cells (Right) were transfected with either an siRNA control or siRNA TSAP6. Immunoblot analysis with an anti-HA antibody confirmed the efficient depletion of overexpressed TSAP6 (Top Right), which resulted in reduced PARP cleavage (Middle Right). β-tub, β-tubulin. (D) Immunofluorescence analysis using an anti-HA antibody (red) verified the depletion of overexpressed TSAP6 by siRNA. (E) Induced expression of TSAP6 promotes apoptosis. Flow cytometry was performed on propidium iodide (PI)-stained nuclei derived from HeLa-Trex-HA-TSAP6 cells before or at the indicated times after the addition of doxycycline (Dox.).

activation in LTR6-as2 and -as4 cells as compared with LTR6 cells (Fig. 2D).

A role of TSAP6 in apoptosis was explored further in transient transfection assays. HeLa cells were transfected with either pGFP or pGFP-TSAP6 expression constructs. GFP⁺ cells were directly visualized and scored for apoptosis over 3 days by determining the percentage of cells that had undergone nuclear shrinkage. These data show that in HeLa cells, GFP-TSAP6 promoted a time-dependent augmentation of apoptosis (Fig. 3A). HeLa cells stably expressing HA-TSAP6 (clones 39 and 51) were isolated and assessed for their growth rate. Fig. 3B shows that compared with parental HeLa and HeLa-vector control cells, which exhibited a relatively similar rate of increase in cell number, HeLa-39 and HeLa-51 cells showed a marked reduction. Moreover, TSAP6 overexpression in HeLa-51 cells correlated with the partial cleavage of PARP (Fig. 3C Middle), suggesting the activation of cell death in these cells. Importantly, this PARP cleavage is likely due to overexpressed TSAP6, because TSAP6 depletion by siRNA led to the disappearance of cleaved PARP (Fig. 3C). Immunoblot and immunofluorescence analysis using an anti-HA antibody confirmed the efficient depletion of overexpressed TSAP6 (Fig. 3C and D).

In addition, HA-TSAP6-inducible HeLa cells were also used in apoptosis assays. Immunoblotting with an anti-HA antibody showed HA-TSAP6 expression 24 h after induction (Fig. 1C *Right*). DNA fragmentation analysis by flow cytometry revealed that by 48 h after doxycycline treatment, 48% of the cells were apoptotic as represented by the sub-G₁ population (Fig. 3E). Overall, these data imply that TSAP6 promotes apoptosis.

TSAP6 Interacts with Nix and with the Myt1 Kinase. To characterize further the functional relevance of TSAP6, a Y2H screen was carried out by using full-length human TSAP6 as “bait” and a cDNA library derived from murine LTR6 cells cultured at 32°C for 4 h. Initial Y2H analysis identified Nix (29) as a TSAP6 binding partner. Three overlapping fragments of Nix were identified consisting of the last 62, 167, and 206 aa, respectively. In addition, a 150-aa COOH-terminal fragment of the Myt1 kinase (Myt1-150) was also identified as a TSAP6 interactor. Yeast mating assays confirmed a specific TSAP6 interaction with both Myt1 or Nix Y2H fragments as well as their respective full-length human counterparts (data not shown). Furthermore, in GST pull-down assays, radiolabeled IVT TSAP6 bound specifically with the GST-Nix and -Myt1 fusion proteins but not with the negative control GST-NKTR. A reciprocal interaction was also detected between GST-TSAP6 and IVT-labeled Myt1 and Nix, demonstrating a direct association between these two proteins and TSAP6 (see Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site).

In vivo interaction analysis was performed to corroborate the above findings. 293T cells were transiently cotransfected with plasmids expressing HA-TSAP6 in combination with either Flag-Nix (Fig. 4A) or Flag-Myt1-150 (Fig. 5A). Western blot analysis of protein complexes immunoprecipitated with anti-HA antibodies revealed that Flag-Nix and Flag-Myt1-150 but not Flag-apoptosis-linked gene-2-interacting protein 1 (AIP) were coprecipitated with TSAP6.

Initial attempts to demonstrate a physical association between endogenous TSAP6 and Nix in nonstimulated cells were unsuccessful. We reasoned that such an association might require an initial signal such as a cell-death stimulus. We therefore took advantage of the observation that activation of endogenous p53 by adriamycin in U2OS cells promotes apoptosis (13). Total cell lysates derived from U2OS cells treated with adriamycin for 0, 4, 8, or 24 h were used to immunoprecipitate TSAP6. Immunoblot analysis with an anti-Nix antibody demonstrated that TSAP6 interacted with Nix in a time-dependent manner (Fig. 4B). Furthermore, an interaction between endogenous TSAP6 and Myt1 was demonstrated also. As illustrated in Fig. 5B, TSAP6 coprecipitated endogenous Myt1 from HeLa-39 cells, K562 cells, and human fetal liver. Thus, TSAP6 associates *in vivo* with both Nix and the Myt1 kinase.

TSAP6 Cooperates with Nix to Promote Apoptosis. The finding that TSAP6 interacts with Nix, a proapoptotic protein, suggested that TSAP6 might exert cell death-related activities, in part, through Nix. We initially investigated the effects of Nix on TSAP6-overexpressing cells by transiently transfecting HeLa-vector and HeLa-51 stable clones with Flag-tagged constructs expressing a negative control (AIP), Nix, or the COOH-terminal portion of Bid (Bid-t). Bid-t is a potent mitochondrial-dependent proapoptotic protein used as a positive control. Flag-positive cells were scored for apoptosis by assessing nuclear shrinkage. Although AIP had negligible effects on cell death in either cell line, excess Nix clearly exacerbated cell death in HeLa cells stably overexpressing TSAP6 (Fig. 4C). This effect appeared to be specific for Nix, because Bid-t promoted cell death to a similar degree in both cell lines. Moreover, immunoblot analysis demonstrated enhanced PARP cleavage in HeLa-51 cells transfected with Nix (Fig. 4D). We reasoned that if TSAP6 and Nix signal through a

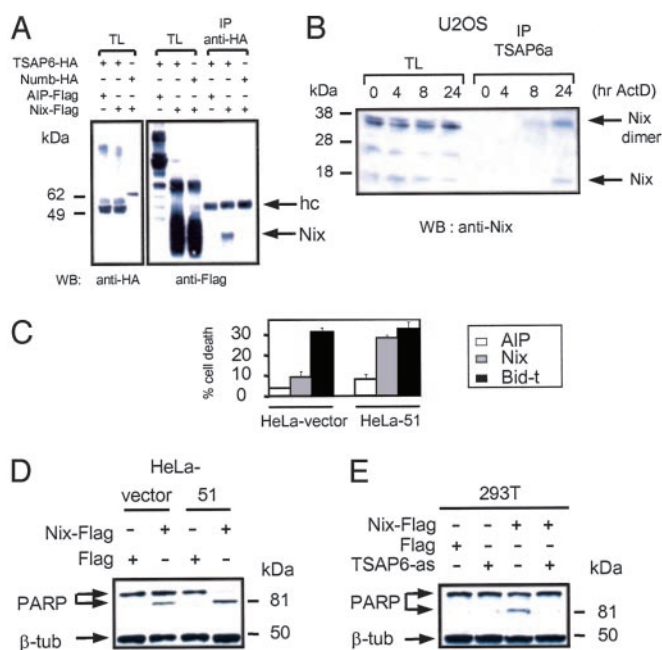


Fig. 4. Interaction and functional analysis of TSAP6 and Nix. (A) HA-TSAP6 and Flag-Nix interact in 293T cells. 293T cells were transiently cotransfected with the indicated expression plasmids. Nix expression levels in total cell lysates (TL) and anti-HA immunoprecipitates (IP) were determined by immunoblotting with anti-Flag antibody. hc, Ig heavy chains; WB, Western blot. (B) Endogenous TSAP6 and Nix interact in U2OS cells under conditions that promote apoptosis. Cell lysates derived from U2OS cells treated with adriamycin were incubated with an anti-TSAP6 antibody coupled to IgY-agarose followed by immunoblotting with an anti-Nix antibody. The Nix dimer is detected as a 38-kDa protein. ActD, actinomycin D. (C) HeLa-51 cells overexpressing Nix are more susceptible to apoptosis. HeLa-vector or HeLa-51 cells were transiently transfected with expression plasmids encoding Flag-tagged proteins containing the AIP negative control, Nix, or COOH-terminal portion of Bid (Bid-t). Flag-positive cells were scored for apoptosis based on nuclear shrinkage. Experiments were performed in triplicate (mean \pm SD). (D) Enhanced PARP cleavage in HeLa-51 cells overexpressing Nix as determined by immunoblot analysis with an anti-PARP antibody. (E) TSAP6 antisense impairs Nix-induced cell death. 293T cells were cotransfected with the indicated expression plasmids. Twenty-four hours after transfection, cell lysates were analyzed for PARP cleavage.

common pathway, TSAP6 antisense should inhibit the cell-death effects of Nix. Indeed, cotransfection experiments in 293T cells demonstrated that although overexpression of Nix resulted in partial PARP cleavage, introduction of TSAP6 antisense blocked this effect (Fig. 4E). Taken together, these data suggest that through their association TSAP6 and Nix may cooperate to augment apoptosis.

TSAP6 Positively Regulates Myt1. The observation that TSAP6 and Myt1 interact suggested that TSAP6 could also participate in cell cycle-related activities. To examine the impact of TSAP6 on cell-cycle progression, HeLa HA-TSAP6 polyclonal cells were used in cell-synchronization studies. A DTB procedure was performed to synchronize cells at the G₁/S border. HA-negative and HA-positive populations were gated (Fig. 5C *Lower Left*) and analyzed by flow cytometry. As expected, HeLa-vector cells displayed a normal progression through S, G₂, and M phases of the cell cycle (Fig. 5C *Upper*). Compared with HA-negative cells, the HA-positive subpopulation of the HA-TSAP6 polyclonal pool contained an additional, predominantly G₂/M population (\approx 25%) that was initially observed before DTB release (Fig. 5C *Lower*). By 12 h, at a time when the HA-negative population initiated a return to G₁, a majority of the HA-positive population

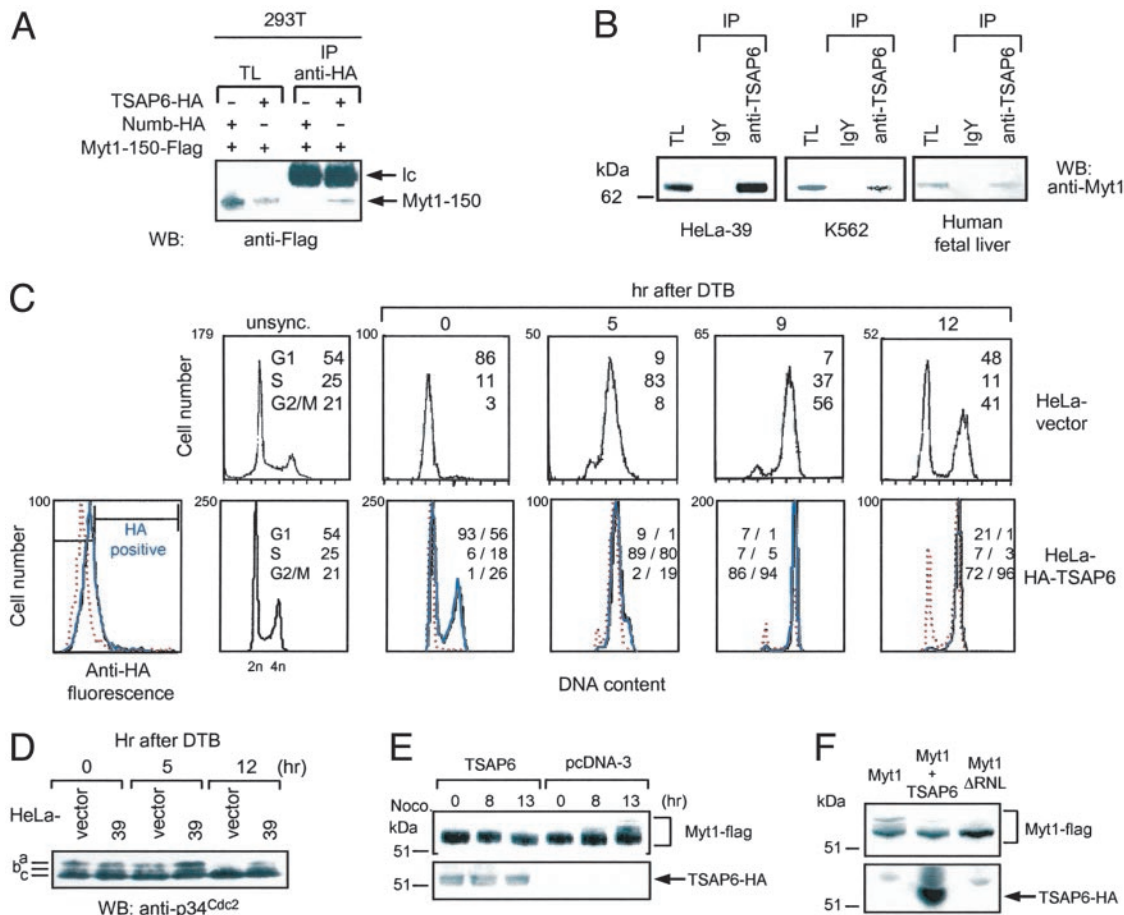


Fig. 5. TSAP6 interacts with Myt1 and influences cell-cycle progression. (A) Overexpressed HA-TSAP6 immunoprecipitates (IP) Flag-Myt1-150 from extracts of 293T cells. WB, Western blot; Ic, Ig light chain. (B) Endogenous TSAP6 and Myt1 interact in HeLa-39 cells (Left), K562 cells (Center), or human fetal liver tissue (Right). Lysates were incubated with either a control antibody or anti-TSAP6a antibody followed by incubation with agarose anti-IgY and Western blot analysis with anti-Myt1 antibody. TL, total cell lysate. (C) Overproduction of TSAP6 induces a G₂/M delay. Polyclonal HeLa-vector and HeLa HA-TSAP6 cells were synchronized at the G₁/S border by a DTB procedure and analyzed by flow cytometry after release from the block. Flow-cytometry analysis was performed separately on either gated HA-positive (solid blue line) or HA-negative (dotted red line) subpopulations (Left). (D) TSAP6 maintains p34^{cdc2} in an inactive state. Cell lysates derived from either synchronized HeLa vector or HeLa-39 cells were immunoblotted by using an anti-p34^{cdc2} antibody. (E) TSAP6 overexpression prevents Myt1 hyperphosphorylation during mitotic entry. 293T cells overexpressing pcDNA3 or pcDNA-TSAP6 in combination with Flag-Myt1 were treated with nocodazole (Noco) for the indicated times. Western blot analysis with anti-Flag (Upper) or anti-HA (Lower) antibodies was used to reveal Myt1 and TSAP6 proteins, respectively, in total cell lysates. (F) The effect of TSAP6 on Myt1 phosphorylation is similar to that of the Myt1ΔRNL mutant alone.

was still in G₂/M. Furthermore, this population was determined to be predominantly in G₂ by analyzing the mitotic index and the phosphohistone H3⁺ and BrdUrd⁺ populations after DTB release of HeLa-39 and -51 cells (see Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site).

The hyperphosphorylation of p34^{cdc2} and Myt1 have been directly correlated with the down-modulation of their respective activities (22, 30). Thus, we addressed whether overexpressed TSAP6 could influence the phosphorylation status of either p34^{cdc2} or Myt1. First, total cell lysates derived from synchronized HeLa-control or HeLa-39 cells either before or after DTB release were analyzed by immunoblotting for p34^{cdc2}. Compared with HeLa vector cells, HeLa-39 cells retained a comparably hyperphosphorylated form of p34^{cdc2} by 12 h after DTB release (Fig. 5D). This is consistent with previous reports on the effects of overexpressed Myt1 on p34^{cdc2} phosphorylation (25).

Next, 293T cells were cotransfected with Flag-Myt1 in combination with either HA-TSAP6 or pcDNA3 control and treated with nocodazole for different times to induce a block in mitosis. Anti-Flag immunoblot analysis on total cell lysates transfected with pcDNA3 revealed a time-dependent increase in the ap-

pearance of additional higher molecular weight species of Myt1 (Fig. 5E). By contrast, these hyperphosphorylated species of Myt1 were not detectable in lysates derived from TSAP6-overexpressing cells even by 13 h. A similar hypophosphorylated phenotype was observed by overexpressing the Myt1ΔRNL mutant alone, which lacks the cyclin B1/p34^{cdc2}-binding motif (ref. 25; Fig. 5F). Overall, these results indicate that TSAP6 modulates the G₂/M transition and regulates the level of phosphorylation of p34^{cdc2} and Myt1.

Discussion

TSAP6 was originally cloned from the murine LTR6 cell line as a transcript induced in response to wild-type p53 activation (1). Accordingly, we have observed that TSAP6 transcripts were also increased by endogenous activation of p53. Moreover, the identification of a p53-response element within the promoter region of TSAP6, conserved between the human and murine genes, argues in favor of the involvement of p53 in the regulation of TSAP6 expression. That TSAP6 antisense impaired p53-mediated apoptosis hinted at the possibility that TSAP6 may participate in cell death-related activities. This observation

prompted us to explore its function further by identifying relevant TSAP6-interacting partners. A Y2H hunt revealed that TSAP6 physically associates with Nix and the Myt1 kinase, and this conclusion was confirmed by *in vitro* and *in vivo* studies.

Our studies point to a cooperation between TSAP6 and Nix in promoting apoptosis. This is supported by the observation that cells overexpressing TSAP6 are more sensitive toward apoptosis and that Nix exacerbates this effect. Similar to Nix, the p53-inducible Bax, Noxa, and Puma promote apoptosis at the mitochondria and associate with Bcl-2 (11, 12, 31). The observations that TSAP6 is up-regulated by p53 and interacts with Nix suggest yet another level of control by p53 on apoptosis.

Nix, a Bcl-2 family member, was originally cloned based on its high degree of homology with BNIP3 (29). Nix was shown to promote apoptosis through its targeting to the mitochondria (29, 32–34). Deletion of the Nix transmembrane domain abrogated both its ability to associate with the mitochondria and to induce apoptosis (29). Recently, a previously uncharacterized isoform of Nix was identified, Nix-short, which was shown to heterodimerize with Nix and block its proapoptotic activity (35).

The identification of Myt1 kinase as a TSAP6 binding partner indicated that TSAP6 could also participate in events related to cell-cycle control. The studies presented here provide evidence that TSAP6 promotes a delay at the G₂/M transition of the cell cycle. Similarly, Liu *et al.* (25) observed that by 14 h after DTB release, the majority of HeLa cells overproducing Myt1 had accumulated at the G₂/M border. Given the similar impact of TSAP6 and Myt1 on cell-cycle progression and the direct

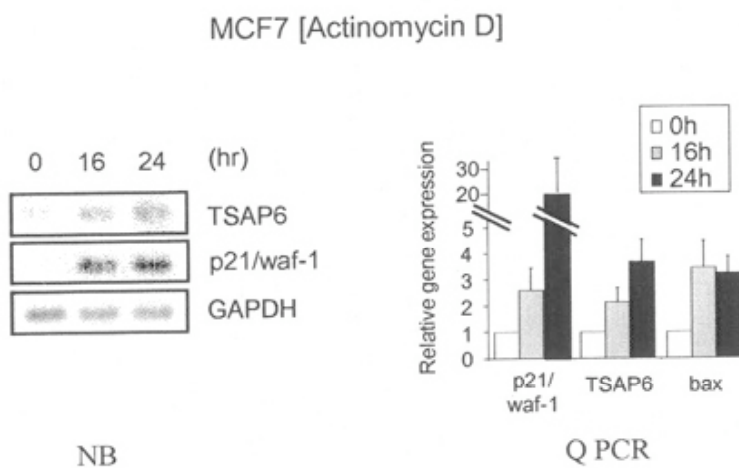
association between these two molecules, we postulated that TSAP6 could act as a positive regulator of Myt1. The maintenance of p34^{cdc2} in an inactive state by TSAP6 overexpression, a pattern highly reminiscent of cells overproducing Myt1 (25), supports this possibility. Finally, the observation that TSAP6 prevents the hyperphosphorylation of Myt1 during entry into mitosis reinforces this hypothesis.

The phosphorylation of Myt1 has been attributed, at least in part, to p90^{rsk} kinase, Akt kinase, and cyclin B1/p34^{cdc2}, all of which down-regulate the activity of Myt1 (22, 36, 37). By contrast, TSAP6 apparently counteracts these effects by promoting Myt1 activity. Interestingly, the binding domain of cyclin B1/p34^{cdc2} has been mapped to an RNL motif present within the COOH-terminal region of Myt1. Consistent with the present data, TSAP6 maintained Myt1 in a hypophosphorylated state, similar to the effects of Myt1ΔRNL alone, suggesting that TSAP6 could interfere with MPF recruitment to Myt1. Alternatively, through its association with Myt1, TSAP6 could either recruit Myt1-specific phosphatases or mask the accessibility of its phosphorylation sites. Future studies may aim at addressing these issues.

We thank N. Privat for technical assistance and J.-P. Roperch for his participation in the initial analysis of some of the Northern blots; W. Taylor (Cleveland Clinic Foundation, Cleveland) for helpful discussions; A. Greenberg (Manitoba Institute of Cell Biology, Winnipeg, MB, Canada) for providing the Nix constructs; and A. Nebreda (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) for providing the anti-Myt1 (3027) antibody.

- Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J.-P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3953–3957.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. & Oren, M. (1991) *Nature* **352**, 345–347.
- Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J.-P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9039–9042.
- Hu, G., Chung, Y. L., Glover, T., Valentine, V., Look, A. T. & Fearon, E. R. (1997) *Genomics* **46**, 103–111.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., *et al.* (1995) *Nature* **375**, 754–760.
- Roperch, J.-P., Alvaro, V., Prieur, S., Tuynder, M., Nemani, M., Lethrosne, F., Piouffre, L., Gendron, M. C., Israeli, D., Dausset, J., *et al.* (1998) *Nat. Med.* **4**, 835–838.
- Zhang, X., Steiner, M. S., Rinaldy, A. & Lu, Y. (2001) *Oncogene* **20**, 5982–5990.
- Steiner, M. S., Zhang, X., Wang, Y. & Lu, Y. (2000) *Cancer Res.* **60**, 4419–4425.
- Gottlieb, T. M. & Oren, M. (1998) *Semin. Cancer Biol.* **8**, 359–368.
- Sionov, R. V. & Haupt, Y. (1999) *Oncogene* **18**, 6145–6157.
- Miyashita, T. & Reed, J. C. (1995) *Cell* **80**, 293–299.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. & Tanaka, N. (2000) *Science* **288**, 1053–1058.
- Nakano, K. & Vousden, K. H. (2001) *Mol. Cell* **7**, 683–694.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993) *Cell* **75**, 817–825.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993) *Cell* **75**, 805–816.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Leder, P. (1995) *Cell* **82**, 675–684.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R. & Stark, G. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8493–8497.
- Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F. & Mowat, M. (1995) *Oncogene* **10**, 109–115.
- Parker, L. L. & Pivnick-Worms, H. (1992) *Science* **257**, 1955–1957.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. (1995) *Science* **270**, 86–90.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Pivnick-Worms, H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 571–583.
- Palmer, A., Gavin, A. C. & Nebreda, A. R. (1998) *EMBO J.* **17**, 5037–5047.
- Finley, R. L. & Brent, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12980–12984.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001) *Nature* **411**, 494–498.
- Liu, F., Rothblum Oviatt, C., Ryan, C. E. & Pivnick-Worms, H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5113–5123.
- Eventoff, W. & Rossmann, M. G. (1975) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **3**, 111–140.
- Hubert, R. S., Vivanco, I., Chen, E., Rastegar, S., Leong, K., Mitchell, S. C., Madraswala, R., Zhou, Y., Kuo, J., Raitano, A. B., Jakobovits, A., Saffran, D. C. & Afar, D. E. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14523–14528.
- Moldes, M., Lasnier, F., Gauthereau, X., Klein, C., Pairault, J., Feve, B. & Chambaut-Guerin, A. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 33938–33946.
- Chen, G., Cizeau, J., Vande Velde, C., Park, J. H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D. & Greenberg, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 7–10.
- Booher, R. N., Holman, P. S. & Fattaey, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22300–22306.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2001) *Mol. Cell* **7**, 673–682.
- Yasuda, M., Han, J. W., Dionne, C. A., Boyd, J. M. & Chinnadurai, G. (1999) *Cancer Res.* **59**, 533–537.
- Matsushima, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K. & Nakamura, Y. (1998) *Genes Chromosomes Cancer* **21**, 230–235.
- Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R. C., Saxena, S., Gietz, R. D. & Greenberg, A. H. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1975–1983.
- Yussman, M. G., Toyokawa, T., Odley, A., Lynch, R. A., Wu, G., Colbert, M. C., Aronow, B. J., Lorenz, J. N. & Dorn, G. W. (2002) *Nat. Med.* **8**, 725–730.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K. & Kishimoto, T. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 111–116.
- Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A. & Hunter, T. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 3361–3371.

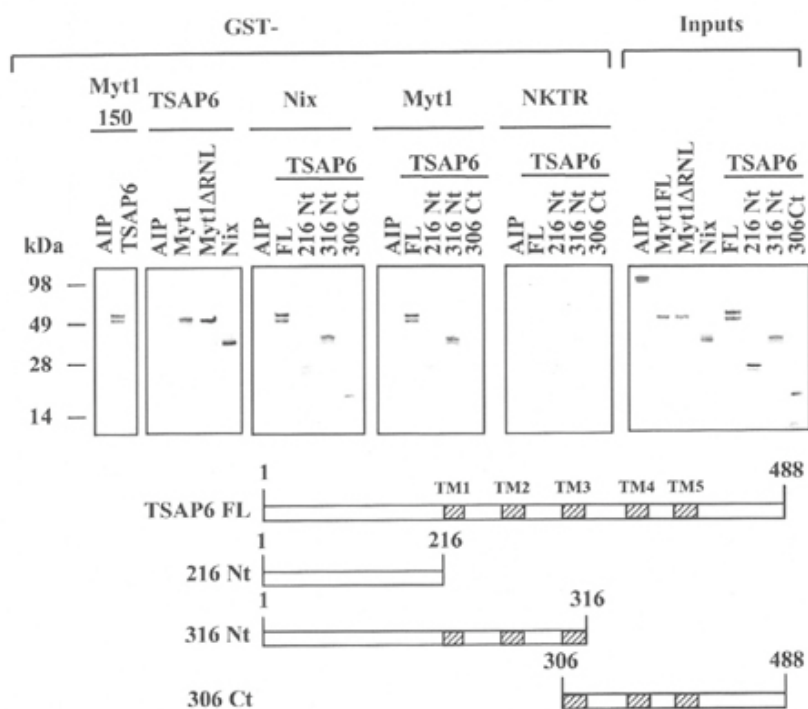
Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 6.

Activation of tumor suppressor activated pathway-6 (TSAP6) expression. Actinomycin D-induced p53 activation in MCF7 cells reveals enhanced levels of TSAP6 expression. (Left) MCF7 cells were treated with 5 nM actinomycin D for 0, 6, or 24 h, and TSAP6 transcripts were subsequently analyzed by Northern blot. For comparison, p21waf-1 expression levels are shown. (Right) Bars represent results from semiquantitative RT-PCR analysis. Relative gene expression levels of p21waf-1, TSAP6, or Bax are shown prior to or after the addition of actinomycin D (5 nM) in MCF7 cells.

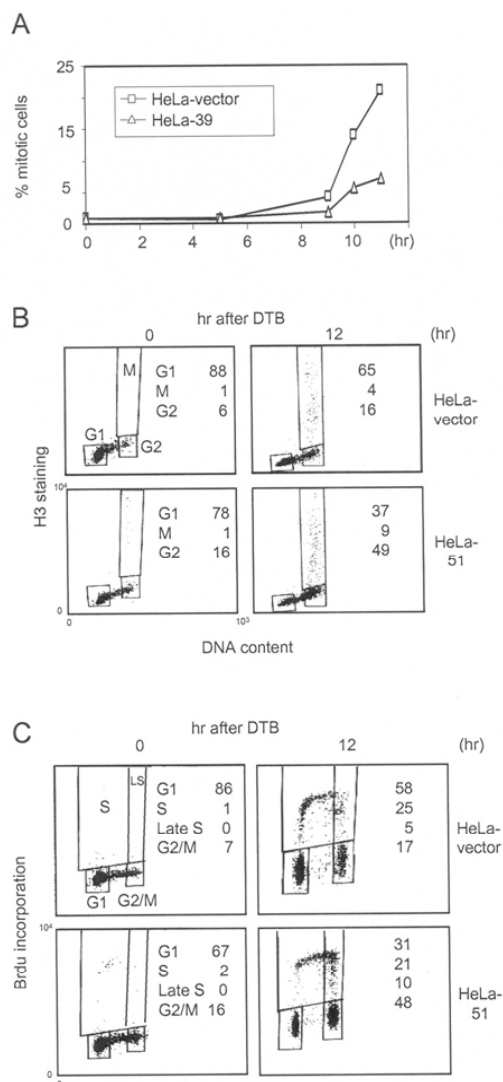
Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 7.

In vitro association of tumor suppressor activated pathway-6 (TSAP6) with Nix and Myt1. GST/*in vitro*-transcribed/*in vitro*-translated (IVT) interactions analysis. Equal amounts of radiolabeled products were incubated with the indicated GST fusion proteins captured on glutathione beads. A reciprocal association was observed either between GST-Nix (lane 8) or GST-Myt1 (lane 13) and IVT TSAP6 and between GST-TSAP6 and either Nix IVT (lane 6) or Myt1 IVT (lane 4). Note also that Myt1_{RNL} (lane 5), which lacks the cyclin B1/p34^{cds2}-binding motif, bound as efficiently to TSAP6 as did the Myt1 wild type. GST-Myt1-150 refers to the Y2H fragment of Myt1 (lanes 1 and 2). GST-NKTR was used as a negative control for IVT interactions (fifth panel). AIP is an ≈120-kDa protein used as a negative control IVT. A diagrammatic representation of TSAP6 full-length (FL) and TSAP6 deletion mutants are shown below. The hatched bars indicate the transmembrane domains (TM1–5), and numbers refer to amino acid positioning. Nt and Ct denote either NH₂- or COOH-terminal amino acid regions, respectively. IVT inputs are indicated (Right).

Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 8.

Overexpression of tumor suppressor activated pathway-6 (TSAP6) induces a G2-phase delay. (A) Overproduction of TSAP6 causes a delay in mitotic entry. Mitotic index analysis was performed on HeLa-vector or HeLa-39 cells. At the indicated time points, at least 600 nuclei were scored for chromosomal condensation by light microscopy. (B and C) HeLa cells overexpressing TSAP6 are specifically delayed at the G2 phase of the cell cycle. Before or 12 h after G1/S release, synchronized HeLa-vector or HeLa-51 cells were fixed and stained with either an antiphosphohistone H3 antibody (B) or labeled by BrdUrd incorporation followed by an anti-BrdUrd antibody. (C) Two-color flow cytometry analysis was performed to determine the percentages of cells either in late S, G2, or M phases of the cell cycle. Note that the overall percentage of cells in the G2 phase was determined by subtracting out the percentages of cells in mitosis and late S phase from the total G2/M-containing population.

Annexe 4

Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene.

Giusy Fiucci,* Alexandra Lespagnol, Pamela Stumptner-Cuvelette, Séverine Beaucourt,
Dominique Duflaut, Laurent Susini, Robert Amson, and Adam Telerman

Genomics
Volume 81, Issue 6, pages 570-578, June 2003.

Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France Corresponding author*



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Genomics 81 (2003) 570–578

GENOMICS

www.elsevier.com/locate/ygeno

Genomic organization and expression of mouse *Tpt1* gene[☆]

Giusy Fiucci,* Alexandra Lespagnol, Pamela Stumptner-Cuvelette, Séverine Beaucourt, Dominique Duflaut, Laurent Susini, Robert Amson, and Adam Telerman

Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France

Received 3 December 2002; accepted 2 February 2003

Abstract

The translationally controlled tumor protein (TCTP), also known as histamine-releasing factor (HRF), is encoded by a gene (*Tpt1*) that is highly conserved throughout phylogeny. TCTP is implicated in cell growth, acute allergic response, and apoptosis. In the present study, seven putative *Tpt1* genes with different chromosomal localizations were identified in the mouse genome. In six of them, analysis of the 5' and 3' untranslated regions revealed the presence of flanking direct repeats and residual poly(A) tails typical of pseudogenes. Only three of the seven genes can produce a protein of the expected molecular weight. We isolated the genomic DNA of these three genes to analyze their sequence, genomic organization, and in vitro promoter activity. We found that mouse *Tpt1* is localized on chromosome 14 with a canonical intron–exon organization, a functional promoter, and only one transcript that is ubiquitously expressed in all tissues. © 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Translationally controlled tumor protein (TCTP protein); Histamine-releasing factor; Pseudogenes; Gene expression; Cancer

Tpt1 encodes the translationally controlled tumor protein (TCTP). TCTP was initially discovered because of its substantial presence in untranslated mRNP particles in a mouse sarcoma cell line [1] and in mouse erythroleukemia cells [2]. It was also found as a highly expressed protein in growing Ehrlich ascites tumor cells [3,4].

TCTP has a molecular mass of 21–23 kDa in both mouse [4,5] and human [6]. Because of its ubiquitous expression [7], high degree of conservation between species [8,9], and presence in tumor and normal cells [10], TCTP can be considered the product of a housekeeping gene. The intracellular localization of TCTP is generally considered cytoplasmic, and it is not associated to any cellular organelles [11]. However, the C terminus of TCTP contains a 45-amino-acid basic region that binds to tubulin [11]. In addition, TCTP is phosphorylated at two serine residues by Plk (polo-like kinase), a protein kinase that regulates spindle function [12]. It has been suggested that this phosphoryla-

tion could decrease the microtubule-stabilizing activity of TCTP and promote an increase in microtubule dynamics.

TCTP is detected in biological fluids of allergic patients [13] and in supernatants from cell cultures [14], suggesting that the protein is secreted. However, TCTP lacks any known secretory signal in the N terminus and is therefore unlikely to follow a classical secretion pathway. Secreted TCTP acts on basophils, inducing the release of histamine [13], and also increases MHC class II expression and Ig production from B cells [14].

Although no primary sequence homology has been found between TCTP and other known proteins, nuclear magnetic resonance (NMR) structure analysis of *Schizosaccharomyces pombe* TCTP reveals similarity with guanine nucleotide-free chaperones such as the human protein family Mss4/Dss4 [15]. These proteins bind to the GDP/GTP free form of Rab proteins, which are implicated in intracellular trafficking [16]; however, no experimental data demonstrating a similar function for TCTP have been reported yet.

The high abundance of TCTP in tumor cell lines and in human tumor biopsy specimens [17] suggested an important role of this protein in carcinogenesis. We have recently shown that downregulation of human TCTP expression in-

[☆] Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Libraries under Accession No. AY186881.

* Corresponding author. Fax: +33-01-44640465.

E-mail address: gfiucci@mail.molecular-engines.com (G. Fiucci).

Table 1
Ensembl database search for *Tpt1* homologs in the mouse genome

Chromosome	Identities ^a	Locations ^b	Ensembl (Accession No.) ^c
14	169/191 88%	66772962–66773152	ENSMUSG00000022004
6	169/191 88%	100712616–100712806	ENSMUSG00000030071
9	168/191 87%	37877024–37877214	ENSMUSG00000040986
X	167/191 87%	84622294–84622484	–
3	160/194 82%	101344748–101344941	–
7	157/192 81%	8006623–8006814	–
4	154/191 80%	53442485–53442670	–

^{a/b} Ensembl identities and chromosomal locations for the *Tpt1* genes are indicated.

^c The accession number for the three highest score hits are also indicated.

duces a reorganization of breast tumor cells into ductal and acinar structures similar to those seen in normal breast [17]. Several studies described TCTP as an anti-apoptotic protein. Upon activation of wild-type p53 function in the M1/LTR6 cells containing a temperature-sensitive p53 mutant [18], many genes are substantially downregulated [19], including *Tpt1*. TCTP also binds the pro-apoptotic myeloid cell leukemia protein-1, a Bcl-2 homolog [20]. Expression of TCTP in HeLa and U2OS cells prevented them from undergoing etoposide-induced apoptosis and inhibited a caspase 3-like activity. Transfection of antisense *Tpt1* in the mammary cancer cell line MCF7 is also associated with massive cell death [21].

The chromosomal localization of human *Tpt1* [22,23] and the genomic organization of rabbit *Tpt1*, [24] have been described. These species have two *Tpt1* mRNAs, which differ in their 3' untranslated region (UTR) because of an alternative polyadenylation site. Quantity and ratio of expression of the two mRNA isoforms vary between tissues. In addition, many *Tpt1*-derived pseudogenes have been found in the rabbit genome and suggested, by BLAST search, in the human [7].

The present work was aimed at investigating the genomic localization and organization of mouse *Tpt1*. Our study reveals the presence of *Tpt1* genes on various chromosomes, leading us to analyze their potential functionality.

Results and discussion

Identification of different mouse *Tpt1* genes

We previously developed different human cell systems of tumor reversion and found 263 genes differentially expressed. Among them, *Tpt1* was highly downregulated in the tumor revertants that display a suppressed malignant phenotype [17]. To identify the mouse homolog of *Tpt1*, we searched the Ensembl genome database with a highly conserved fragment corresponding to the third exon of human *Tpt1* (Accession No. AJ400717, nts 2111–2301). The blast analysis showed numerous *Tpt1*-

related sequences dispersed throughout the entire mouse genome. A search in the same database with *Tpt1* mouse cDNA (Accession No. NM_009429) [5] yielded an equivalent result. The seven highest scores of both blasts were identical and localized putative *Tpt1* genes to chromosomes 3, 4, 6, 7, 9, 14, and X (Table 1). Chromosome (Chr) 6, 9, and 14 *Tpt1* genes are considered a cluster of genes in the Ensembl database. A BLAST search with the mouse cDNA in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database also identified most of the *Tpt1*-like sequences supplied by Ensembl. It is of note that the NCBI database links the published mouse *Tpt1* mRNA (NM_009429) to chromosome 6. The present study is based on the seven highest score sequences obtained from Ensembl database searches.

Comparison and analysis of the mouse *Tpt1* genes

Alignment of the seven putative cDNA *Tpt1* genes shows a high level of similarity starting at the ATG and including their 3' UTR (Fig. 1). Chr 3, 4, and X *Tpt1* genes show many differences in their 5' ends. Chr 7 *Tpt1* presents short additional sequences that do not seem to correspond to introns because they lack typical splicing sites. Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes show the highest similarity, containing elements described by Gross et al. [6], Thiele et al. [24], and Chitpatima et al. [5]. The first element is a typical polypyrimidine tract (CTTTTCCG), important for translational regulation. The mammalian target of rapamycin, situated downstream of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) signaling pathway, was reported to participate in the regulation of such translationally controlled elements [25,26]. The second element is a GC-rich segment in the 5' part, generally present in housekeeping genes. The third element is an AT-rich sequence at the 3' end; it is described to induce instability of the mRNA [27] and it is also found in human *Tpt1* [6]. Note that between the Chr 6 and 14 *Tpt1* cDNAs there are only two base pairs of difference in the 5' end (Fig. 1). The mutations observed in the predicted cDNA sequence of Chr 3, 4, 7, and X *Tpt1* genes result in the interruption of the open reading frame. Therefore, these genes should not be able to produce proteins with the

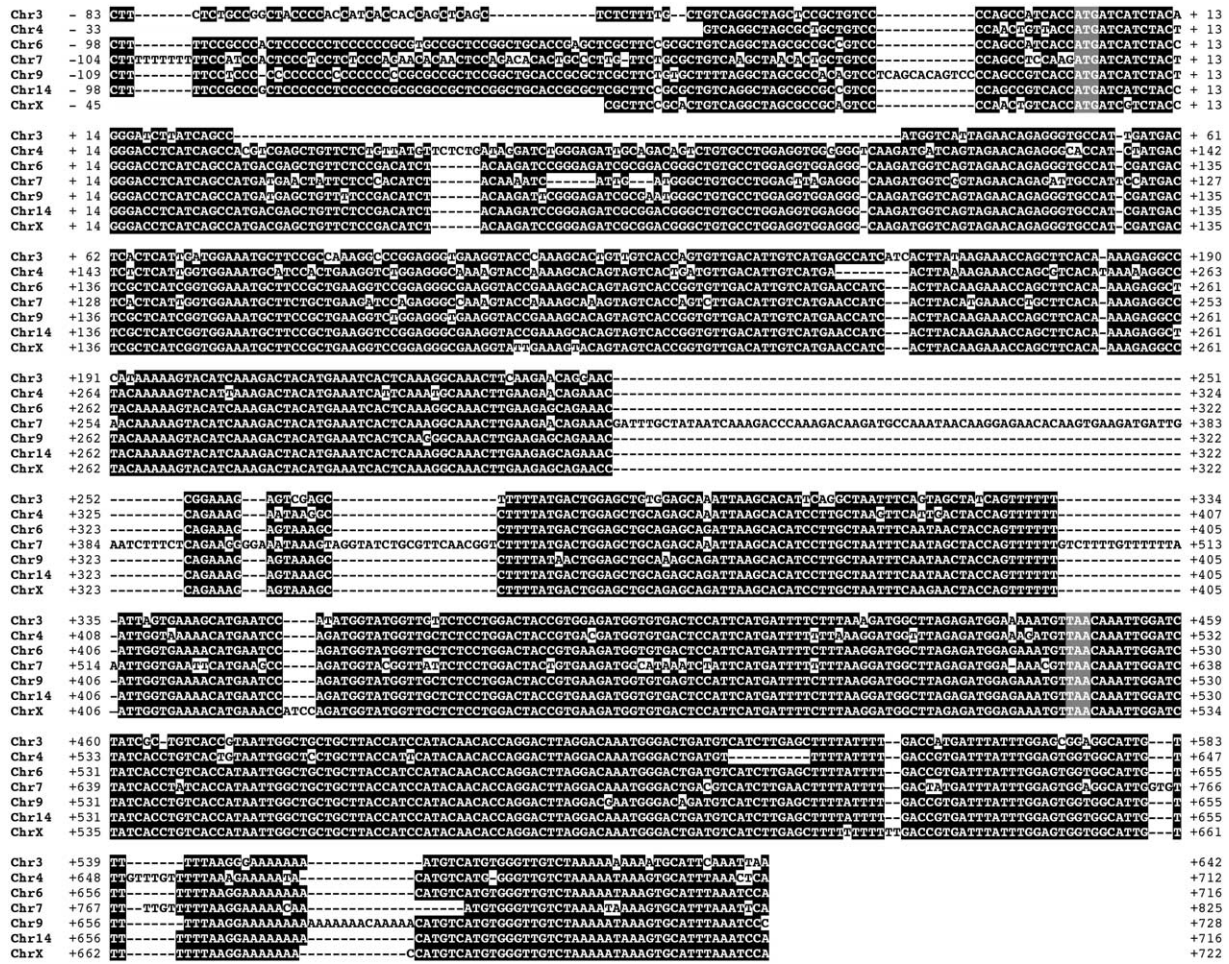


Fig. 1. Alignment of the *Tpt1* sequences. ClustalW multiple alignment of the *Tpt1* sequences showing the similarity between the *Tpt1* genes resident on different chromosomes. Identical nucleotides are indicated in black. Gray nucleotides show the start and stop codons.

expected molecular weight of TCTP. Finally, no apparent transcription initiation site was found on the *Tpt1* genes situated on chromosomes 4 and X, suggesting that transcription of these genes is not possible.

In conclusion, the sequence analysis limited the number of genes able to express functional TCTP to the genes situated on Chr 6, 9, and 14.

To verify our computational studies we first sequenced 3 kb upstream and 3 kb downstream the Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes. We then tested by Southern blot analysis the presence of a *Tpt1* on Chr 6, 9, and 14. For this purpose, genomic DNA was digested with enzymes that generate fragments among which only one is recognizable by both cDNA *Tpt1* and a chromosome-specific probe. Fig. 2A shows that cDNA *Tpt1* recognizes several fragments. The specific probes for Chr 6, 9, or 14 detected one band per digestion reaction (Figs. 2B–2D). Each of these bands corresponded in size to one of the fragments recognized by the cDNA probe in Fig. 2A. We therefore conclude that a *Tpt1* is present on Chr 6, 9, and 14.

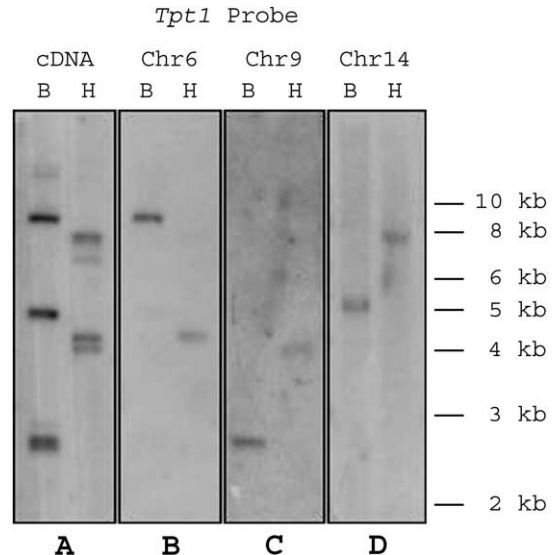


Fig. 2. Southern blots on mouse genomic DNA. Southern blots of mouse genomic DNA digested with *Bam*HI (B) or *Hind*III (H). The hybridization with the *Tpt1* cDNA probe reveals several bands (A). Specific probes designed in the 5' UTR region of diversity of the Chr 6, 9, or 14 *Tpt1* genes were then used to identify the different bands (B, C, D, respectively).

Table 2
Identification of flanking repeated sequences

<i>Tpt1</i>	5'-Flanking region ^a	3'-Flanking region ^a
Chr3	... <u>gata</u> <u>ctatttcg</u> aggcCTT.....GTC...	...AAATTAA (a) ₅ t (a) ₃ t (a) ₃ g (a) ₄ gaa <u>actatttcg</u> agata...
Chr4	...cagtttaggaagggga (n) ₁₂₆ cctGTC...	...AAACTCActttt (a) ₆ cg (a) ₅ (n) ₂₃ aatttaggaagtc...
Chr6	...ctagaatttcagaatcacgCTT..CGC..GTC...	...AAATCCA (a) ₃ gaa <u>tttcagaatcac</u> acc...
Chr7	...aagaatgtatcagggaggCTT.....GTC...	...AAATTCA (a) ₃ (t) ₅ caaatgtatcaggaagtg...
Chr9	...aaattggagagatagCTT..CGC.....	...AAATCCC (c) ₆ (a) ₈ ttggagagaaagctc...
ChrX	...caagtatgagccaCGC..GTC...	...AAATCCActtt (a) ₁₅ caagtatgagccaacta...

^a Direct repeats representing the genomic integration sites are underlined. Nucleotides of the cDNA are indicated in capital letters.

Identification of pseudogenes

Because many human and rabbit *Tpt1* pseudogenes have been described [7], it was possible that some of the mouse *Tpt1*s found were also pseudogenes. Pseudogenes are sequences of genomic DNA that are very similar to normal genes but that are regarded as nonfunctional copies of genes. They can be generated by duplication or by retrotransposition and defined as nonprocessed or processed pseudogenes, respectively. Retrotransposition is a reverse transcription of a mRNA transcript with subsequent re-integration of the cDNA into the genome. Such processed copies of genes are characterized by the presence of both direct repeats flanking the complete cDNA sequence and residual poly(A) tails.

Sequence analysis indicated that the 5'- and 3'-flanking regions of Chr 3, 4, 6, 9, and X *Tpt1* genes contained direct repeats and residual poly(A) sequences indicative of putative processed pseudogenes (Table 2). For Chr 7 *Tpt1* we were able to find direct repeats, but no remaining poly(A) tail. Because Chr 7 *Tpt1* also contains nucleotide stretches in addition to the cDNA, it rather resembles a nonprocessed pseudogene. By contrast, none of these features were observed for Chr 14 *Tpt1*. Moreover, sequence analysis of genomic *Tpt1* genes revealed the absence of introns for Chr 6 and 9 *Tpt1* genes and an intron–exon organization for Chr 14 *Tpt1*. Thus, the structure and organization of mouse Chr 3, 4, 6, 7, 9, and X *Tpt1* genes reveal that they are pseudogenes, whereas Chr 14 *Tpt1* may represent the functional gene. It is of note that the cDNA sequence predicted from the Chr 14 *Tpt1* cDNA is identical to the sequence published by Chitpatima et al. [5], except for two nucleotides in the polypyrimidine tract.

Study of the expression of the *Tpt1* genes

Pseudogenes are generally considered inactive, but some studies report the transcription of processed and unprocessed pseudogenes [28,29]. To establish which of the *Tpt1* genes is (are) expressed, we conducted reverse transcription on total RNA from the mouse M1 cell line. We subsequently sequenced the products obtained by PCR using a reverse poly(T) primer and a forward primer common to Chr 6, 9, or 14 *Tpt1* genes. A RACE PCR approach on total

RNA of pooled mouse tissues was also used. Sequence analysis of 27 clones from reverse transcription and 20 clones from the RACE experiments showed that only the *Tpt1* localized on chromosome 14 was expressed. Sequencing of the 3' UTR revealed also a unique polyadenylation site, in contrast to human and rabbit genes in which two mRNAs deriving from alternative polyadenylation sites have been found [7].

To test the presence of different transcripts in various tissues, we carried out quantitative RT-PCR (Fig. 3). Specific primers were designed for amplification of Chr 6 or 14 *Tpt1* genes and for Chr 9 *Tpt1*. Using quantitative RT-PCR, it was not possible to find primers able to discern between the highly homologous Chr 6 and 14 *Tpt1* genes. Once we verified that these primers were working properly on the isolated genomic clones and that they were specific for the *Tpt1* genes localized on different chromosomes (Fig. 3A), we concluded that in all tissues analyzed, only the expression of a transcript amplified by the primer Chr 6/14 *Tpt1* genes was detectable (Fig. 3B).

To further analyze the expression of the mouse *Tpt1* gene in different tissues, we used the full-length *Tpt1* cDNA as a probe for Northern blot experiments. *Tpt1* was found expressed in all the tissues analyzed, with the lowest expression level in brain and the highest in liver and kidney (Figs. 3C and 3D). Only one *Tpt1* transcript was detected in all the tissues analyzed (Fig. 3C).

We then investigated the expression of Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes by their in vitro promoter activity (Fig. 4). Equal fragments of the 5'-flanking region (–1041/+188, position calculated from the ATG) of the *Tpt1* genes present on Chr 6, 9, and 14 were cloned into a promoterless luciferase vector and transiently expressed in 293T cells. In these cell lines the Chr 14 *Tpt1* has a promoter activity 3 times higher than the simian virus-40 (SV40) promoter and 30 times higher than the Chr 6 *Tpt1* promoter. A similar situation was earlier described in the rabbit, in which two of the identified pseudogenes showed in vitro promoter activity [7]. Chr 9 *Tpt1* was not expressed in our analysis. Further studies on the promoter of Chr 14 revealed that the region restricted to the –280/+188, still containing the TATA box (see Fig. 5B), has a 5-fold lower promoter activity than region –1041/+188. The region –60/+188, which does not contain the TATA box, has no promoter activity. In contrast to

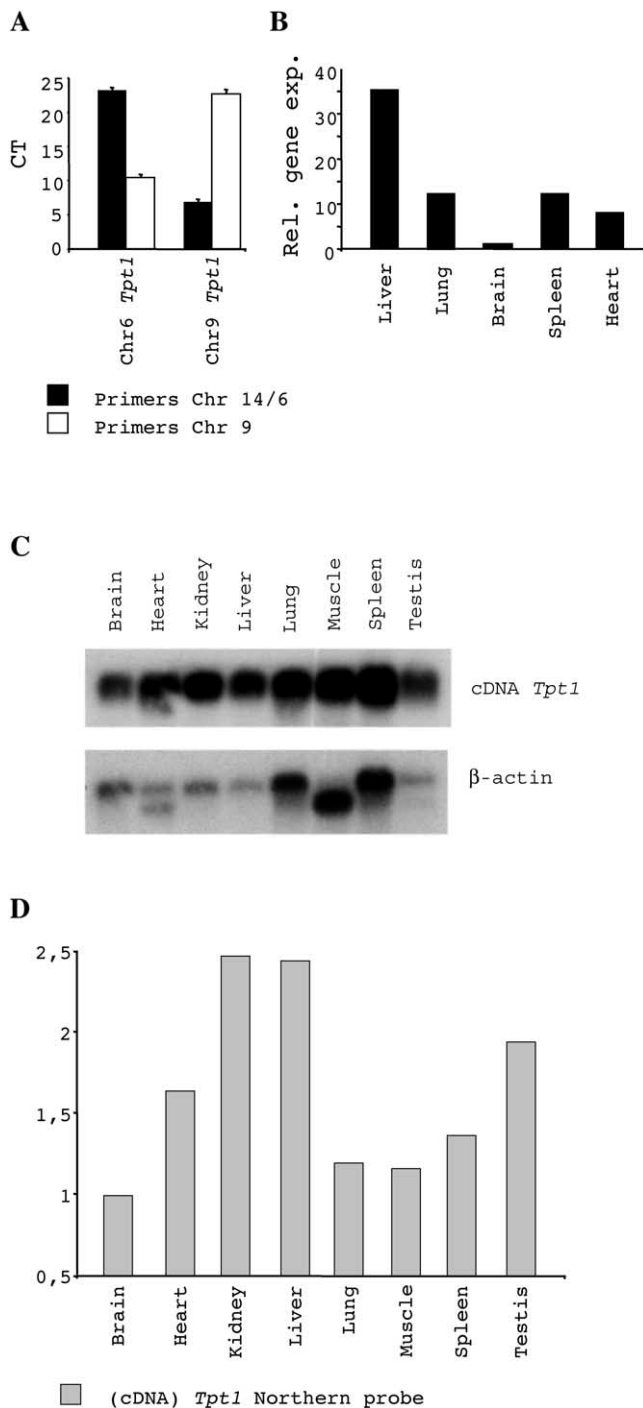


Fig. 3. Tissue distribution and expression of *Tpt1*. Quantitative RT-PCR using primers specific for chr 9 *Tpt1* or Chr 6 and 14 *Tpt1* (the two last primers do not differentiate between the *Tpt1* genes on the two chromosomes). (A) Specificity of the primers on either the template Chr 6 *Tpt1* or the template Chr 9 *Tpt1*. CT, Cycles of threshold. (B) Only the expression of the transcript amplified by the primer Chr 6/14 *Tpt1* were detectable in the mouse tissues analyzed. The graph shows the relative gene expression. The data shown are representative of three independent experiments. (C) Poly(A)⁺ northern blot of mouse mRNAs from different tissues (Stratagene) hybridized with mouse *Tpt1* cDNA (Accession No. NM_009429). (D) Quantification of the northern blot shown in (C) using a β -Imager.

NCBI Locus Link, which situates mouse *Tpt1* only on Chr 6, our data strongly indicate that Chr 14 *Tpt1* is the functional gene encoding TCTP.

Genome organization of the mouse *Tpt1* gene

We sequenced 2.9 kb at the 5' UTR and 2.9 kb at the 3' UTR of the Chr 14 *Tpt1*, which allowed us to complete and confirm the data partially present on the Ensembl database (Accession No. ENSMUSG00000022004). A search of the NCBI database revealed the contig Mm14_WIFeb01_281 sharing identity with our resulting sequence. The presence of the marker *D14Mit116* (position 14, 43.0 cM) in this contig indicates its position on Chr 14, confirming the localization of *Tpt1* in the mouse genome at ~11 kb from this marker.

We defined the *Tpt1* genomic structure by comparison between the genomic sequence, the cDNA sequence resulting from RACE and RT-PCR experiments, and the mRNA sequence found in the NCBI database (Accession No. NM_009429). The 516-bp cDNA is interrupted by five introns (of 160, 513, 300, 444, and 738 bp) whose splicing sites follow the GT/AG rule (Fig. 5A). The translation initiation site is present on exon 1. The translation termination site TAA and the 3' UTR are found on exon 6. A similar genomic organization has earlier been reported for the rabbit and human *Tpt1* genes [24].

Computational analysis of a putative promoter region is a useful first approach to identify binding sites for transcription factors on the basis of similarity to typical consensus sequences. We then used the Transfac database to search for typical promoter elements and possible transcription factor-binding sites in the 5' UTR of Chr 14 *Tpt1*. In the analysis of 1.35 kb upstream of the ATG, we found a TATA box in typical position (–30 nts from the transcription-initiation site). The potential binding sites for transcription factors are shown in Fig. 5B. The 3' end contains three sequences rich in AT. Such sequences have been described as inhibitory elements because of their involvement in mRNA destabilization and inhibition of translation [27]. This theoretical analysis reveals a high similarity between the promoter region of mouse *Tpt1* and the one described in rabbit [24].

In conclusion, mouse *Tpt1*, whose protein product TCTP is involved in tumor growth, allergic response, apoptosis, and cellular organization, is a gene localized on Chr 14 band D2. The 4.2-kb *Tpt1* genomic region, described in the present study, contains a functional promoter, six exons, five introns, and three putative inhibitory elements.

Materials and methods

Sequence analysis

NCBI and Ensembl databases were searched with the BLAST algorithm [30]. Alignment of the different se-

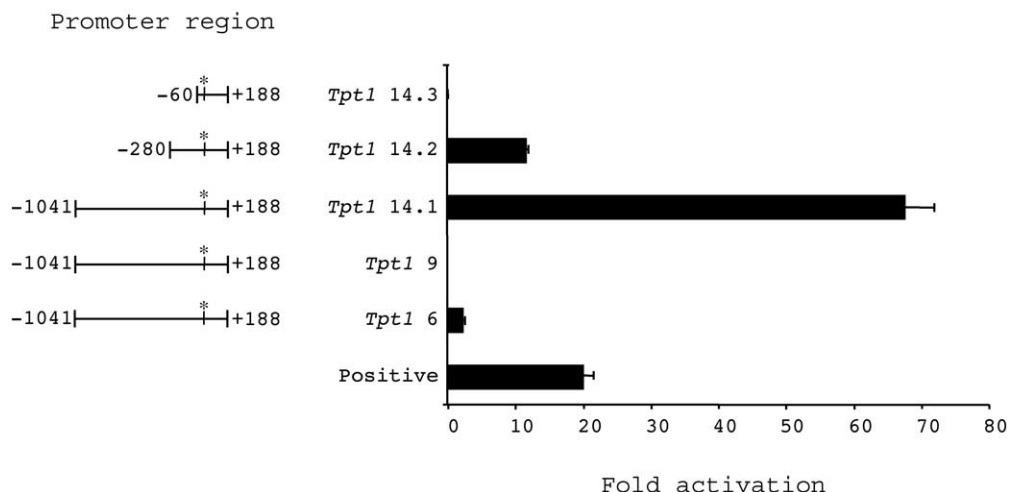


Fig. 4. Luciferase assay. Transcriptional activities of the *Tpt1* genes promoter measured by luciferase assay. The positive control corresponds to the SV40 promoter. The luciferase activity is normalized to the negative control (empty vector). The fold of activation was calculated as the ratio between normalized activity and negative control activity. The * indicates the starting codon. The standard deviation was calculated using four independent experiments.

quences was undertaken using the ClustalW multiple-alignment software [31]. The promoter region was analyzed using the MatInspector program version 2.2 on Transfac 4.0 genome database (<http://transfac.gbf.de>) [32].

Cloning of genomic *Tpt1*

Genomic mouse DNA was extracted from embryonic stem (ES) cells using a lysis buffer containing 4 M urea, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mg/ml proteinase K, and 0.1 mg/ml RNase. Different genomic fragments were obtained by PCR reaction using 100 ng of the genomic DNA and following the manufacturer's instructions (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics, France). These fragments were cloned in pBluescript II SK(+) (Stratagene, CA, USA) and sequenced using an Applied Biosystems 3700 ABIPrism.

Southern blot

Twelve- μ g of mouse genomic DNA was digested with either *Bam*HI or *Hind*III (NEBiolabs, MA, USA). The resulting samples were divided into four wells and run on a 0.8% agarose gel before being capillary-transferred to a nylon membrane (Positive TM membrane, Appligene, France). We prehybridized the four lanes separately for 1 h at 68 °C in 20 ml of QuickHyb solution (Stratagene, CA, USA) containing 40 μ g/ml salmon sperm DNA. *Tpt1* cDNA was obtained by reverse transcription from M1 cells. This cDNA was used as a template to generate the probe starting from the ATG and ending at the TAA (Accession No. NM_009429). Probes specific for each chromosome were designed in the 5' end of the gene as follow: Primers for Chr 6: Forward: 5'-TCAACTAGTGTGCAGTGGTAT-

GAGAGGTA-3' Reverse: 5'-TTCGAGCTCTCTAGTCC-ATGCAGCTGCAT-3' Primers for Chr 9: Forward: 5'-GG-GATGCATTGACTTAAGGTGTGAGG-3' Reverse: 5'-GG-GTAATCCCTGAGCAAATGTAGCACC-3' Primers for Chr 14: Forward: 5'-CTCCGCGAGCAAAACCGGTGCAGTCT-GTGG-3' Reverse: 5'-ATCCGGGGACTCTGCTGGGACA-CAATGCGG-3'

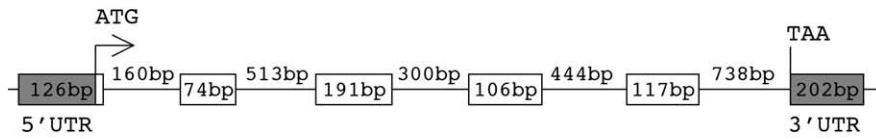
Probes were amplified by PCR on genomic ES cell DNA, purified on agarose gels, and radioactively labeled using the Rediprime II kit (Amersham, France), and 50 ng of each was added to the prehybridizing solution. Hybridization was conducted for 2 h 30 min at 65 °C. Membranes were washed and exposed to Biomax MR films (Kodak, France).

Quantification of the mRNA levels by Northern blotting and real-time PCR

Poly(A)⁺ MessageMap Northern blots were bought from Stratagene (CA, USA). The *Tpt1* cDNA was used as probe and the normalization was done using β -actin cDNA. For the quantitative analysis the membranes were exposed on a β -Imager 2000 (Biospace Mesures, France). A first acquisition was made with the *Tpt1* and a second with β -actin, both using a reference membrane to correct data from possible efficiency variation (<8% measured). The activity of each band was measured by integrating the counts per minute (c.p.m.) of the band and corrected by noise subtraction and efficiency.

For semi-quantitative analysis of mRNA levels by real-time PCR, total RNA from various mouse tissues was prepared using RNeasy mini kit (Qiagen, France). cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA with High-Capacity cDNA Archive kit (Perkin Elmer, MA, USA). PCR reactions from 1 ng of cDNA template were done on ABI 7700 and 7900 Taqman, using SYBR Green 1 master mix (Per-

A



B

```

-1350             agaatatgtttggggatctatgtaaatgagcatttttgaataatttgaanaat -1299
                                           MZF1             S8
-1298  gaatacctgggatgtgcaanaatgattcacataaactcagaataaactgagtttgagactgctaaagtcatagccoctcg -1219
                                           IK2             AF1
-1218  ttctatgtctacgtttttctgatgtcttctactttttactgttaccocgtgtccttttagagtatctagaaagcagcaga -1139
                                           GATA1
-1138  ccaccgcactcttaagtggacggtttttctctgctcctttggctagagttttatcctgaatgggtttactctgtgcttgta -1059
                                           NF1
-1058  acacttgtttagtggtaactgccttctcctttgacataactaaccttctgtccgagggcaggcagggtggtctatg -979
                                           SRV2
-978  tcttcttaagcggagaaaattgcaactagggttacacaggactataaccaaatctggaaggaagaactgtgattt -899
-898  atcttgccacacatgttttacctgaacggctgggtctcggaaagttgtatgttgactctgtggtgagcggaaagcccttca -819
-818  agtgaccocggcgaagtgggaagctccttattttgggtctgtttagtctgcacgcaggaataaaagggaataaaagtga -739
                                           IK2             GATA1
-738  caatcacagaactgtcctaacaaaggacaccgtttgcaccaagagcagaacaggccagcgaagagctgcccggccagacc -659
-658  caccgagaggttctactttcggaaccactagaggacacagtcctccaggacatctcctcctcggagcaaaacccgttgcagt -579
                                           MZF1
-578  ctgtggggcagccaaggcaggcggaggtgaggagaccgggaaccaaccggccgcatcccgtagtcccccaggctcaagcg -499
                                           NF1             CEts1p54             MZF1
-498  gcgcggccgcaacaacgtcatccgatctgctgacattttcttccgagaaaaggggtggaaactgaagcgcgtggccggga -419
-418  ggcgggggcagctcacaccctggccacggccggggcggcgaactcaagcgtccggccatcggctcggccgaagtcccttccc -339
                                           SP1
-338  gtcccagcatgcccggggcgcactatccgcacacggcccccgttgccccgcgaccccaggggcactccgcattgtgtccc -259
                                           SP1
-258  agcacagtccccggatgcccctccggggcggcggcggctagcccacgccccgcacccgccccctgcttaccagtcaccgctg -179
                                           GATA2             ATF1
-178  acgacagtccccggggagcccgggagcgtgacgtagcgcagcgtgcccctctatatagggtggggagcggcccgctcggc -99
                                           c-Ets1             ATF, AP1fj             TATA             MZF1
-98  CTTTTCGCCCGCTCCCCCTCCCCCGCGCGCGCTCCGGTGCACCGCGCTCGCTCCCGGCTGTGAGCTAGCGCCG -19
-18  CCGTCCCAGCCGTCACC ATG ATC ATC TAC CGG GAC CTC ATC AGC C gtaagtccggcgcccgccggggc -51
1      M I I Y R D L I S H 10
+52  tgggtcgggtgggcaacggggagggcggggaacagagcagagcttggccgggagcccgcggtgcgcggagcccg -131
+132  cggggaaatgggggctctcgtctcgtccacggcggtctctctggctcccttcaag AT GAC GAG CTG TTC +202
11                                         D E L F F 14
+203  TCC GAC ATC TAC AAG ATC CGG GAG ATC GCG GAC GGG CTG TGC CTG GAG GTG GAG GGC AAG +262
15  S D I Y K I R E I A D G L C L E V E G K 34
+263  gtgagcggggcgcgcggcgggggaggctggcgcctgctcgcgggttgccgagccggggcggtggcggcc +342
+343  gcggggagggccgctggaactcgtgcaatcctcgtgcgcgcctccagggggagagacgctcttgcggccttgggttttt +422
+423  ctgaaaaagtggagcggcggagccgagcctggaaataggtccgcgcaactcagcgcctccttctcggggcgaacgggaca +502
+503  tattgtctataagacaggtttgcgctgtgcgcgcttaaccocgtggcgactcagagagggccacagcaacttggtccgct +582
+583  tgatgagagtgaccacctctctcagtcocgggcaacgcaactatttggggtaggttaagatggttcaggagagctgactgat +662
+663  cggttcggcagcctttttttttctctcttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt +740
+741  ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt +806
35  M V S R T E G A I D 45
+807  TCG CTC ATC GGT GGA AAT GCT TCC GCT GAA GGT CCG GAG GGC GAA GGT ACC GAA AGC ACA +866
46  S L I G G N A S A E G P E G E G T E S T 65
+867  GTA GTC ACC GGT GTT GAC ATT GTC ATG AAC CAT CAC TTA CAA GAA ACC AGC TTC ACA AAA +926
66  V V T G V D I V M N H H L Q E T S F T K 85
+927  GAC GCT TAC AAA AAG TAC ATC AAA GAC TAC ATG AAA TC gtaagtacataaacccccgttttggtg +993
86  E A Y K K Y I K D Y M K S 98
+994  gtcagcttctagaagaagtgggttgcttaggtaggaagggccttaagaaggagggcttttggttatacagtgaaagttg +1073
+1074  atttcaataatgtgagcaagcggtagaaagttactttaaaggtaatataggaatcacatcttttaaatggttctctgt +1153
+1154  tcaactagtaaacatcattttgctagaagaacattacactattggagcttatattcttacttcaagaagattatcagtt +1233
+1234  attttgatgacctgttacttactgttttag ATC AAA GGC AAA CTT GAA GAG CAG AAA CCA GAA +1298
99  L K G K L E E Q K P E 109
+1299  AGA GTA AAG CCT TTT ATG ACT GGA GCT GCA GAG CAG ATT AAG CAC ATC CTT GCT AAT TTC +1358
110  R V K P F M T G A A E Q I K H I L A N F 129
+1359  AAT AAC TAC CAG gtaaatggaccaaaaggtttgtataataactgtgggatccgaaaagctgtgtctctcgtgta +1434
130  N N Y Q 133
+1435  catggctctggctgctcctggaacaccttagaccagttacctcagcctctgagatgaaagtctcagcccattttgtgt +1514
+1515  agcaccaccaccagggcaagagctgtgattaaaatgatagcattgtctttcttctcattgagactgttatctgtagaccag +1594
+1595  actagccttgaaccocagaggtctcactgacagcctccttaattgctgggattaaaggtgtgtgccaacatggctagcat +1674
+1675  atgtgtatttttgagaactagggtttttcttgccaattttggccaggggttatctggatctgctttttatagatttg +1754
+1755  attttatatttgggtgataagatagctcaattgtaggttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt +1826
134  F F I G 137
+1827  GAA AAC ATG AAT CCA GAT GGT ATG GTF GCT CTC CTG GAC TAC CGT GAA GAT GGT GTG ACT +1886
138  E N M N P D G M V A L L D Y R E D G V T 157
+1889  CCA TTC ATG ATT TTC TTT AAG GAT GGC TTA GAG ATG GAG AAA TGT gtaagtatctttaaattagtt +1951
158  P F M I F F K D G L E M E K C 172
+1952  agtgcacaagcagggagtcagcagtgattctttgcatctgcaggtggcagggcctgtgagattgtgagatctttatctc +2031
+2032  gtgggagatgagcctgcaacatgaaagggccttgaagatgagattagctggcttgctagagctcctcagggctcagttgt +2111
+2112  gtaagtattttgacactggcctgggataaacctcagctagaaatgagtggtctctgcccacggtagtctcaagctccattc +2191
+2192  catattacatgcaataggatgttctcaggtttactgaggtcagtaagaaggaatacagaaaatgtctgttttataaggacc +2271
+2272  tgggtgagacagtgctcctgctcactagattttggaggctttttttttagaacacagtagaaggtgagtttagagatgact +2351
+2352  ggagaaagtgggtgaccocctgggacagtggggttaggaggtttattcagacaacacagctggtgtttgtcagtagagcactg +2431
+2432  gaggggcaggaagatgggtgagtgctgccaactcggtaggggtctgcactccactgatagacctgcaacagttttgtgtgt +2511
+2512  gttctctgtggttgcactaggtgcaaaaaggaaactctcctcgtctctcctgctcctttgtgagcagttcagattgaaat +2591
+2592  tagggagtagcctacatgcttaggacagttataagctcagggctggggcagttgttaagccatctctgtttttggagc +2669
+2670  TAA CAAATTGGATCTACCTGTCAACCAATAATTGGCTGCTGTACCATCCATACACACCAGGACTTTAGGACAAA +2748
173 * 173
+2749  TGGGACTGATGTCATCTTGGCTTTTATTATTGACCGTGATTTATTGGAGTGGTGGCATTGTTTTTTAAAGGAAAAAAA +2828
+2829  CATGTCATGTGGGTGTCTAAATAATAAAGTCATTTAAATCCA +2871

```

Fig. 5. Organization and genomic sequence of *Tpt1*. (A) Intron-exon organization of the mouse Chr14 *Tpt1*. (B) Complete sequence of the mouse Chr14 *Tpt1*. Putative binding sites for transcription factors are underlined and indicated in the 5' UTR. Three possible translation-inhibitory elements in the 3' UTR are also underlined. Coding sequence nucleotides are in capital letters. The corresponding amino acids are indicated below.

kin Elmer, MA, USA). All primers were verified against the mouse genome databases, and tested on the constructs for specificity. Their sequences are as follows: Chr 6/14/X Forward: 5'-CCGGGAGATCGCGGAC-3' Chr 9 Forward: 5'-GATTCGGGAGATCGCGAAT-3' Reverse: 3'-TTCCACC-GATGAGCGAGTC-5' (common to Chr 6, 9, 14, and X *Tpt1*)

Relative gene expression values were obtained with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with respect to the endogenous β_2 -microglobulin RNA.

Analysis of the reverse transcripts of *Tpt1s*

We used 5 μ g of total RNA from mouse M1 cell lines for reverse transcription with T-Primed First Strand kit (Amersham, France). One-tenth the reaction was used for PCR with Expand Long Template (Roche, France). The primers used for the PCR are the following: Reverse: 5'-GAGAGCG-GCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (poly dT with *NotI* site) Forward: 5'-CCCCTCGACGCCGCTCCGGCTGCA-CCG-3' (5' UTR region of sequence identity)

The PCR products obtained were cloned in pBluescript at *NotI* and *Sall* sites. RACE-PCR was performed using the Marathon cDNA Amplification kit (Clontech, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, total RNA derived from pooled mouse tissues (brain, heart, lung, liver, kidney, muscle, testis, and ovary) was subjected to reverse transcription using a modified oligo d(T) primer. The resulting cDNAs were ligated to an adapter and used as templates for PCR in the following primers: Forward: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (adapter-specific primer) Reverse: 5'-ATGGATATCGACAATGTCAACACCGGTGAC-3' (*Tpt1* primer)

The PCR products were cloned into pBluescript at the *NotI* and *EcoRV* sites. Control PCR reactions using the same primers directly on the RNA samples were done to rule out any possible contamination by remaining genomic DNA. Reverse transcription and RACE-PCR clones were sequenced using the T7 primer.

Luciferase assay

The promoter region -1041/+188 of Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* have been cloned into a pGL3 enhancer vector (Promega, USA). Furthermore, two shorter regions, -280/+188 and -60/+188, of Chr 14 *Tpt1* promoter were analyzed. These constructs were transfected into the 293T cell line using Lipofectamine Plus reagents (Invitrogen, France) following the manufacturer's instructions. After 24 h the cells were washed and lysed in a buffer containing 25 mM Tris phosphate, 8 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton, and 15% glycerol. Luciferase activity was measured with the Victor Luminometer (Perkin Elmer, MA, USA) on the cell lysates supplemented with luciferin (Boehringer Mannheim, Germany) and 1 mM ATP. The empty pGL3 enhancer vector was used as negative control, and the pGL3 SV40 control vector (Promega, WI, USA) as positive control.

Acknowledgment

We thank Biospace Mesures (10 Rue Mercœur, 75011 Paris, France) for the quantification of the Northern blots.

References

- [1] R. Yenofsky, I. Bergmann, G. Brawerman, Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5876–5880.
- [2] R. Yenofsky, S. Cereghini, A. Krowczynska, G. Brawerman, Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide, Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 1197–1203.
- [3] R. Benndorf, P. Nurnberg, H. Bielka, Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis, Exp. Cell. Res. 174 (1988) 130–138.
- [4] H. Boehm, et al., The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure, Biochem. Int. 19 (1989) 277–286.
- [5] S.T. Chitpatima, S. Makrides, R. Bandyopadhyay, G. Brawerman, Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells, Nucleic Acids Res. 16 (1988) 2350.
- [6] B. Gross, M. Gaestel, H. Bohm, H. Bielka, cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein, Nucleic Acids Res. 17 (1989) 8367.
- [7] H. Thiele, M. Berger, A. Skalweit, B.J. Thiele, Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP), Eur. J. Biochem. 267 (2000) 5473–5481.
- [8] A. Pay, E. Heberle-Bors, H. Hirt, An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein, Plant Mol. Biol. 19 (1992) 501–503.
- [9] L. Bini, et al., Two-dimensional gel electrophoresis of *Caenorhabditis elegans* homogenates and identification of protein spots by microsequencing, Electrophoresis 18 (1997) 557–562.
- [10] J.C. Sanchez, et al., Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes, Electrophoresis 18 (1997) 150–155.
- [11] Y. Gachet, et al., The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin-binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle, J. Cell. Sci. 112 (1999) 1257–1271.
- [12] F.R. Yarm, Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 6209–6221.
- [13] S.M. MacDonald, T. Rafnar, J. Langdon, L.M. Lichtenstein, Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor, Science 269 (1995) 688–690.
- [14] H.S. Kang, et al., Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor, J. Immunol. 166 (2001) 6545–6554.
- [15] P. Thaw, et al., Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones, Nat. Struct. Biol. 8 (2001) 701–704.
- [16] J.L. Burton, M.E. Burns, E. Gatti, G.J. Augustine, P. De Camilli, Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily, EMBO J 13 (1994) 5547–5558.
- [17] M. Tuynder, et al., Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 14976–14981.
- [18] E. Yonish-Rouach, et al., Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, Nature 352 (1991) 345–347.

- [19] R.B. Amson, et al., 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. USA 93 (1996) 3953–3957.
- [20] D. Zhang, F. Li, D. Weidner, Z.H. Mnjoyan, K. Fujise, Physical and functional interaction between MCL1 and fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone, J. Biol. Chem. 30 (2002) 30.
- [21] F. Li, D. Zhang, K. Fujise, Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein, J. Biol. Chem. 276 (2001) 47542–47549.
- [22] M. de Fatima Bonaldo, et al., Identification and characterization of three genes and two pseudogenes on chromosome 13, Hum. Genet. 97 (1996) 441–452.
- [23] S.M. MacDonald, W.A. Paznekas, E.W. Jabs, Chromosomal localization of tumor protein, translationally controlled 1 (TPT1) encoding the human histamine-releasing factor (HRF) to 13q12 >q14, Cytogenet. Cell. Genet. 84 (1999) 128–129.
- [24] H. Thiele, M. Berger, C. Lenzner, H. Kuhn, B.J. Thiele, Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23, Eur. J. Biochem. 257 (1998) 62–68.
- [25] M. Kleijn, et al., Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells, J. Biol. Chem. 273 (1998) 5536–5541.
- [26] B. Raught, A.C. Gingras, N. Sonenberg, The target of rapamycin (TOR) proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 7037–7044.
- [27] V. Kruys, B. Beutler, G. Huez, Translational control mediated by UA-rich sequences, Enzyme 44 (1990) 193–202.
- [28] F. Renaudie, A.K. Yachou, B. Grandchamp, R. Jones, C. Beaumont, A second ferritin L subunit is encoded by an intronless gene in the mouse, Mamm. Genome 2 (1992) 143–149.
- [29] R. Chakrabarti, J.B. McCracken Jr., D. Chakrabarti, W.W. Souba, Detection of a functional promoter/enhancer in an intron-less human gene encoding a glutamine synthetase-like enzyme, Gene 153 (1995) 163–199.
- [30] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215 (1990) 403–410, doi:10.1006/jmbi.1990.9999.
- [31] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673–4680.
- [32] K. Quandt, K. Frech, H. Karas, E. Wingender, T. Werner, MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 4878–4884.

Annexe 5

Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion

Marcel Tuynder*, Giusy Fiucci*, Sylvie Prieur*, Alexandra Lespagnol*, Anne Geant*,
Severine Beaucourt*, Dominique Duflaut*, Stephanie Besse*, Laurent Susini*, Jean
Cavarelli†, Dino Moras†, Robert Amson*‡, and Adam Telerman*‡§

Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.
Volume 101, Number 43, pages 15364-15369, October 26 2004.

**Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; and †Institut de Genetique
et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France*

Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion

Marcel Tuynder*, Giusy Fiucci*, Sylvie Prieur*, Alexandra Lespagnol*, Anne Géant*, Séverine Beaucourt*, Dominique Duflaut*, Stéphanie Besse*, Laurent Susini*, Jean Cavarelli†, Dino Moras†, Robert Amson**‡, and Adam Telerman**§

*Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; and †Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France

Communicated by Georges Charpak, European Organization for Nuclear Research, Geneva, Switzerland, September 10, 2004 (received for review June 22, 2004)

By analyzing the gene expression profile between tumor cells and revertant counterparts that have a suppressed malignant phenotype, we previously reported a significant down-regulation of translationally controlled tumor protein (TCTP) in the revertants. In the present study, we derived, by using the H1 parvovirus as a selective agent, revertants from three major solid cancers: colon, lung, and melanoma cell lines. These cells have a strongly suppressed malignant phenotype both *in vitro* and *in vivo*. The level of TCTP is decreased in most of the revertants. To verify whether inhibition of TCTP expression induces changes in the malignant phenotype, in the classical, well established model of "flat reversion," v-src-transformed NIH3T3 cells were transfected with anti-sense TCTP. By inhibiting the expression of TCTP, the number of revertant cells was raised to 30%, instead of the reported rate for spontaneous flat revertants of 10^{-6} . Because TCTP encodes for a histamine-releasing factor, we tested the hypothesis that inhibitors of the histaminic pathway could be effective against tumor cells. We show that some antihistaminic compounds (hydroxyzine and promethazine) and other pharmacological compounds with a related structure (including thioridazine and sertraline) kill tumor cells and significantly decrease the level of TCTP. All together, these data suggest that, with tumor reversion used as a working model, TCTP was identified as a target and drugs were selected that decrease its expression and kill tumor cells.

A "target" in cancer can be defined as a protein whose expression or biological function is different between normal and tumor cells. Such a modification will be harmful to the normal cell, leading to transformation, and thus targeting it and changing its activity could lead to the suppression and/or reversion of the malignancy.

The general approach used so far to identify such target proteins was to analyze the difference between normal and cancer cells, thus answering the question of how a normal cell becomes malignant. We have suggested a different approach, namely to analyze what causes a malignant cell to revert (1–4). One of the advantages of such a strategy is that the revertant cell has acquired the molecular knowledge of how to escape malignancy. We suggested that in such revertant cells the molecular mechanisms to override cancer are present (1–4). The understanding of how this reversion happens may lead to the identification of targets that were not disclosed by comparing normal and tumor cells.

The premises of tumor reversion were discovered in the mid-1960s, when investigators established a cell line of normal mouse fibroblasts, NIH3T3, and the first studies pointed toward a sensitivity to contact inhibition in culture. This sensitivity was caused by a reversible arrest of growth in G_1 (5). After infecting this cell line with polyoma virus, or simian virus 40 (SV40), there was a loss of sensitivity to contact inhibition, and the NIH3T3 grew in clusters and multilayers. In 1968, Pollack, Green, and Todaro (6) described for the first time the selection of sublines of NIH3T3 infected with polyoma or SV40 that had regained an increased sensitivity to contact inhibition and, most importantly,

a decreased tumor-producing ability. They called these cells "revertants." Later studies led to the discovery of K-rev, a 21-kDa protein with revertant-inducing activity on Kirsten sarcoma virus-transformed NIH3T3 cells (7, 8). These experiments focused at obtaining revertants by interfering specifically with a single oncogene-induced tumor. In contrast, our studies in which revertants were derived from human tumor cell lines originating from patients' material harboring the full range of abnormalities present in the tumor cell provide a more comprehensive approach of tumor reversion.

We have previously described translationally controlled tumor protein (TCTP) as a gene down-regulated in tumor reversion (4). It was initially identified (9) as one of four mRNA that occur predominantly as untranslated, partially suppressed messenger ribonucleoprotein particles in mouse sarcoma ascites cells and further characterized as p23/p21 (10, 11). TCTP is a house-keeping gene expressed in several nontumoral cells, including erythrocytes (12). The first overexpression experiments in the analysis of TCTP showed its binding to tubulin (13, 14).

Besides these intracellular functions for TCTP, this molecule has been identified as a histamine-releasing factor (HRF) (15). More recently, the solution structure of TCTP suggests a strong homology with Mss4, a chaperone binding GDP/GTP free G protein (16). TCTP also interacts with TSAP6, translation elongation factor eEF1A, and its guanine nucleotide exchange factor eEF1B- β (17–19).

In the present study we extend the analysis of reversion to some of the major cancers. We further demonstrate that down-regulation of TCTP can, by itself, induce tumor reversion, and we describe drugs that decrease the level of TCTP and kill tumor cells.

Materials and Methods

Revertant Cells. The tumor cells lines DLD-1, A549, WM115 and 266-4, SK-MEL28, and Hs852T were obtained from the American Type Culture Collection. For the isolation of revertants we applied the same technology as described (4). Different concentrations of H1 parvovirus were used to infect tumor cells with a multiplicity of infection of 10–1,000 plaque-forming units per cell. Surviving colonies were isolated by using collagenase/dispase (Roche Diagnostics). Growth of isolated colonies and parental tumor cell lines was tested in soft agar (agar-noble, Difco). A total of 10^7 cells per site were injected in *scid/scid* mice for *in vivo* tumorigenicity tests, and statistical analysis on the growth was performed as described (3). H1 parvovirus DNA was

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: TCTP, translationally controlled tumor protein; HRF, histamine-releasing factor.

*R.A. and A.T. contributed equally to this work.

§To whom correspondence should be addressed: E-mail: atelerman@molecular-engines.com.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

amplified by using the following primers: 5'-CTAGCAACTCT-GCTGAAGGAACTC-3' and 5'-TAGTGATGCTGTTGCTG-TATCTGATG-3'.

Antibodies. For Western blot analysis the following antibodies were used: antihistamine-releasing factor (TCTP) (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) and antiactin (Santa Cruz Biotechnology). For immunofluorescence analysis, phalloidin-FITC (Sigma), anti- α -tubulin (Sigma), anti-mouse CY3, and 4',6-diamidino-2-phenylindole were used. Anti-H1-parvovirus virions antibodies were generated in rabbits by injecting 5×10^9 plaque-forming units per cell per rabbit of UV-inactivated H1 parvovirus (Agro-Bio, La Ferté St. Aubin, France).

Flat Revertant Cells. NIH3T3 cells were transformed with v-src. Foci were isolated and maintained in culture for 4 weeks before the isolation of flat revertants. The antisense TCTP was generated by cloning the cDNA corresponding to the coding region of *tpt1/TCTP* 3'-5' in pBK-RSV (Stratagene). Transfection of v-src-transformed NIH3T3 cells with antisense TCTP was performed by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), clones were selected with G418 (600 μ g/ml), and further subclones were isolated.

Pharmacological Compounds. All pharmacological compounds were purchased from Sigma, except sertraline and paroxetine, which were purchased from Sequoia Research Products (Oxford, U.K.) and Apin Chemicals (Oxon, U.K.), respectively.

Cell Viability Assays. The cytotoxicity of the pharmacological compounds was measured on U937 cells by treating the cells for 6 days with various concentrations of the compounds. ATP level was measured by a luminescent cell viability assay. Celltiter-glo (Promega) was used following the manufacturer's instructions and read on a Victor2 plate reader (PerkinElmer).

In Vivo Evaluation of Antitumor Effect of Pharmacological Compounds. Subcutaneous tumors from MDA-MB231 and U937 cells were induced by injecting 10^7 cells into the right flank of *scid/scid* mice. Treatment (promethazine at 22.5 mg/kg, sertraline at 18.0 mg/kg, and thioridazine at 6.75 mg/kg) started 2 days before the injection of the tumor cells in the early-stage protocol, or when tumors reached a palpable volume (4 mm³) for late-stage treatment. For U937-derived tumors, mice were treated once a day with an i.p. injection over a period of 28 days and monitored over a period up to 80 days. For the MDA-MB231 tumor-bearing animals the same treatment lasted 60 days, and they were monitored for 80 days.

Results

Identification of Revertants from Colon, Lung, and Melanoma Cancer Cell Lines. Our previous conclusion on revertants was based on cells derived from two leukemia cell lines (K562 and U937) and three breast cancer cell lines (BT20, T47D, and MDA-MB231). To consolidate the concept of tumor reversion it was important to have other models of reversion, especially for solid tumors. We then derived revertants from colon, lung, and melanoma tumor cells. DLD-1 is a colorectal adenocarcinoma cell line, A549 is a lung carcinoma cell line, and WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28, and Hs852T are melanoma cell lines.

To obtain these revertants, we used the approach as described (1, 2, 4): the tumor cells were infected with H1 parvovirus that kills preferentially the malignant cells (20, 21), while sparing their normal counterparts and cells that are resistant to the cytopathic effect of the virus. Resistant clones were isolated, and their phenotype was assessed by measuring anchorage depen-

dence in a soft agar assay (Fig. 1A) and their tumorigenicity in *scid/scid* mice (Fig. 1B).

The colon cancer cells DLD-1 form a large number of colonies in soft agar, whereas the two revertant clones, CL-4 and CL-16, display anchorage dependence and hardly grew under the same conditions (Fig. 1A). *In vivo* tumorigenicity in *scid/scid* mice showed a three-time reduced tumor volume at the end of the study compared with the parental cell line. The two revertants from the lung carcinoma A549 were isolated; CL-46 showed strong anchorage dependence in soft agar (Fig. 1A) and strongly reduced growth in *scid/scid* mice (Fig. 1B). The other revertant, CL-1, did not grow at all under the same conditions (Fig. 1A).

These CL-1 cells totally reverted, showing a complete suppression of their malignant growth. Four melanoma cell lines were used. WM-115 and WM-266-4 both were derived from the same patient; WM-115 was from the primary tumor and WM-266-4 was from a metastasis. SK-MEL-28 and Hs852T were the other melanoma cell lines. All four melanomas were highly susceptible to the killing effect of the H1 parvovirus. We show the reduced tumorigenicity of the revertant clone obtained from WM-266-4 (Fig. 1A and B).

Persistent Infection and Expression of H1 Parvovirus Is Not Necessary for Maintaining the Suppressed Malignant Phenotype.

An important question to answer was whether the suppressed malignant phenotype in the revertants is caused by continuous production of the H1 parvovirus. Our previous experiments indicated that both revertants derived from the leukemia cell lines (K562 and U937) continue to be H1 parvovirus-positive for years after the initial infection (1, 2). For the breast cancer cell lines, the revertants derived from BT20 and T47D do not produce any virus at all anymore, whereas the revertants derived from MDA-MB231 continue to produce parvovirus (4). These results suggested that persistent H1 parvovirus infection is not necessary for maintaining the suppressed malignant phenotype in all of the revertants. The PCR analysis shows that both revertants of DLD-1, one of the two revertants from A549, and none of the melanoma revertants are H1-positive (Fig. 1C). The tumor cells DLD-1, A549, and WM-266-4 and their isolated revertants were thus analyzed for the presence of H1 virions by fluorescence-activated cell sorting (Fig. 4A, which is published as supporting information on the PNAS web site). Low amounts of the revertant cells from DLD-1 and A549 tumor cells stained positive for H1 viral particles, suggesting that only a small percentage of these revertants produces infectious virus. Interesting to note is that the DLD-1 revertant CL-16 produces infectious virus capable of replicating in SV40-transformed newborn human kidney cells, but cannot induce plaque formation on the same indicator cells. Conversely, the DLD-1 revertant CL-4 harbors a host range mutant of the virus that lost its ability to induce lysis of the indicator cell line NBE (Fig. 4B).

The limiting dilution assay of A549 parental and revertant clone CL-1 shows that 32% of the revertant cells produce infectious H1 particles (Fig. 4B). The melanoma revertant WM266-4-C14 was found to be negative in fluorescence-activated cell sorting analysis for viral particles (Fig. 4A) and for producing infectious virus (Fig. 4B).

These data confirm that the virus by itself is not sufficient for maintaining the suppressed malignant phenotype.

TCTP Expression in the Revertant Cells. In the study of reversion, we observed that the gene that is the most strongly down-regulated is TCTP, and we partially correlated the process of reversion to inhibition of TCTP expression (4). We found that decreasing TCTP by antisense cDNA in U937 cells promotes apoptosis, whereas knocking down its expression in breast carcinoma cell lines induces a reorganization by forming ductal/acinar structures similar to those structures described by Bissell's group (22).

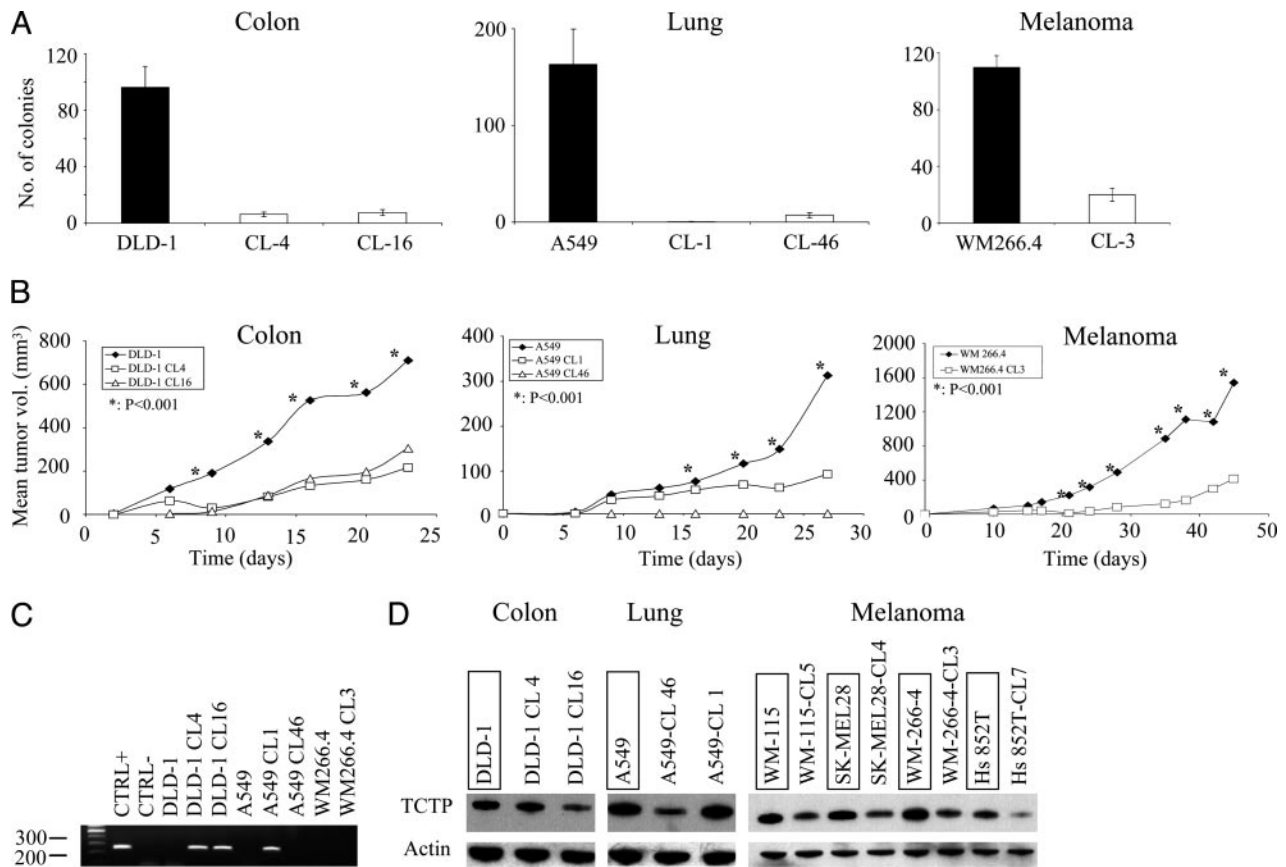


Fig. 1. Tumor revertants for colon, lung, and melanoma cell lines. (A) *In vitro*, soft agar growth for colon (DLD-1), lung (A549), melanoma (WM266.4), and corresponding revertants reported as number of colonies. (B) *In vivo* tumorigenicity after injection of 10^7 tumor or revertant cells, measured as mean tumor volume. (C) PCR analysis to detect the presence of H1 parvovirus. (D) Western blot analysis for TCTP expression in tumor (control cell lines are boxed) and revertant cells. Actin is used as loading control.

In the present study, we checked the level of TCTP expression. In one of the two colon revertant models (DLD-1 CL-16), one of the lung (A549 CL-46) revertant models, and all of the melanoma revertant models, the level of the protein is significantly reduced (Fig. 1D). These results, taken together with the previous data (4) obtained from revertants, suggest that in the majority of cases there is a down-regulation of TCTP expression during the process of tumor reversion.

Induction of Flat Revertants in v-src-Transformed NIH3T3 by Inhibition of TCTP Expression. To position our data on TCTP and its role in reversion into the classical framework of “flat reversion” carried out in the late 1960s, we investigated how v-src-induced transformation could be influenced by the level of expression of TCTP. The transformation of NIH3T3 by v-src induces foci formation on cell monolayer and colony formation in soft agar. The flat revertant cells are generally defined as a variant of a malignant cell in which the characteristic high-saturation density and piled-up morphology have reverted to the flatter morphology associated with nontransformed cells.

Of relevance is the fact that in NIH3T3 transformed by v-src, the expression of TCTP is highly increased and the use of a TCTP antisense cDNA, although reducing the TCTP expression, strongly increases the percentage of reversion up to 30% (Fig. 2A and C). This increase is extremely high when compared with the spontaneous rate of reversion that was previously established as being one upon 10^6 (6). The morphology of v-src-transformed NIH3T3 is typically piled up, whereas the antisense TCTP gives rise to flat revertants (Fig. 2B) and is able to restore contact

inhibition and anchorage-dependent growth (Fig. 2D). The cell density at confluence is another parameter we tested to better define the flat revertants derived by inhibition of the expression of TCTP. This density is also strongly decreased when the expression of TCTP is inhibited (Fig. 2E). These results suggest that targeting TCTP and decreasing its level of expression in v-src-transformed NIH3T3 leads to strong reversion of the malignant phenotype.

Identification of Chemical Compounds Killing Tumor Cells and Down-Regulating the Expression of TCTP. Once we established that TCTP is a valid target in tumors and an important molecule in tumor reversion, we tried to find molecules that could inhibit its expression. TCTP is also known as a HRF (15), so we hypothesized that compounds inhibiting the histaminic pathway also could inhibit the function of HRF and have an anticancer effect. We then searched for chemical compounds already known to antagonize the histaminic pathway. Brompheniramine, hydroxyzine, promethazine, and dexchlorpheniramine are known to be effective antihistaminic drugs. We tested the *in vitro* effect of these drugs on human leukemia U937 (Fig. 3A). Incubation of the cells with the drugs at different concentrations for 6 days revealed that hydroxyzine and promethazine had a significant cytopathic effect. Conversely, brompheniramine and dexchlorpheniramine, both part of the same chemical group of alkylamines, did not have any significant cytopathic effect. We then investigated whether structurally related molecules would have a cytopathic effect on cancer cells. Thioridazine, sertraline, perphenazine, chlorpromazine, paroxetine, and flupenthixol,

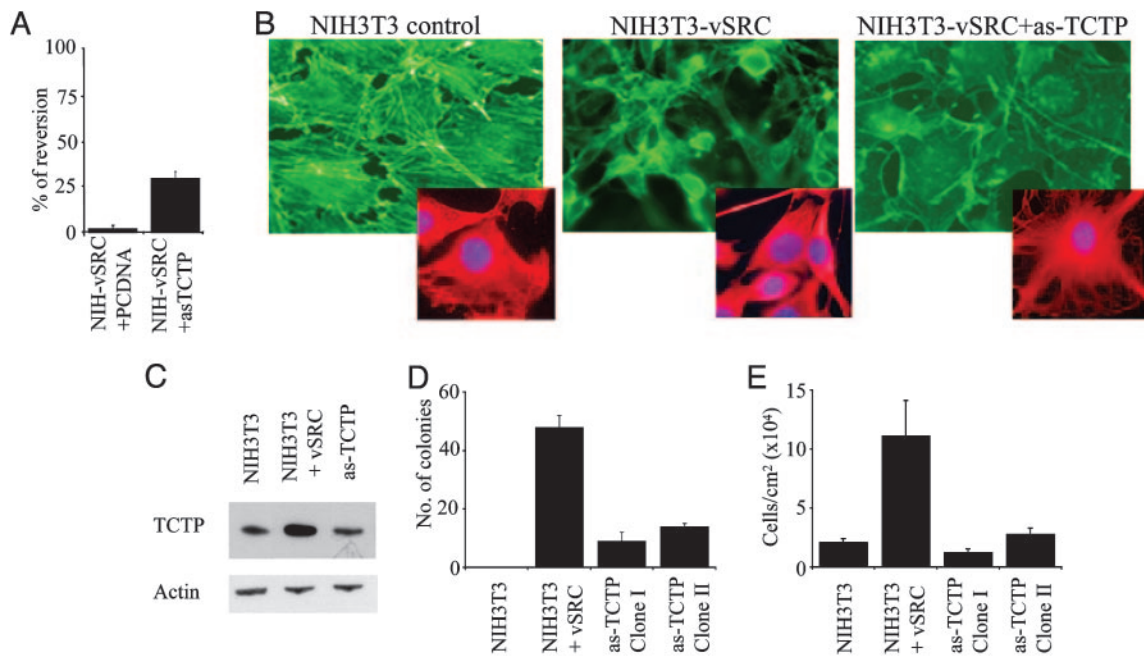


Fig. 2. Flat revertants induced by antisense TCTP in v-src-transformed NIH3T3 cells. (A) Percentage of tumor reversion in NIH3T3 v-src and NIH3T3 v-src transfected with antisense TCTP. (B) Phalloidin (green) and α -tubulin (red) staining in the indicated cell lines. (C) Western blot to measure TCTP expression. (D) Soft agar analysis of NIH3T3, NIH3T3 v-src, and two flat revertants. (E) Maximum reachable cell density at confluence.

generally with no pronounced antihistaminic properties, showed higher cytotoxicity at lower concentrations (Fig. 3A).

We checked the effect of these drugs on TCTP expression (Fig. 3B and Fig. 5, which is published as supporting information on the PNAS web site). A correlation between the cytopathic effect and inhibition of the expression of TCTP can be observed. The down-regulation of the protein does not seem to be caused by inhibition of transcription or protein degradation caused by cell death. On the contrary, the results indicate an increase in the expression level of TCTP mRNA after drug treatment (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site). The compounds also were used *in vivo* on breast cancer MDA-MB231 and monocytic leukemia U937 cell lines (Fig. 3C). The volume of the tumors generated by injection of the cell lines into *scid/scid* mice was consistently reduced by drug treatment. Administration of drugs 2 days before the injection of the tumor cells (early-stage model) highly reduced the growth of the tumor in the animal (Fig. 3C). Administration of drugs when tumors reached a palpable volume (4 mm³) (late-stage treatment) also inhibited growth (Fig. 3C). For all drugs tested in the animals at the concentrations described here, there was no weight loss or any other general signs of toxicity present. These results suggest that these drugs have an anticancer effect by reducing directly or indirectly the level of TCTP.

Discussion

The aim of this study was to provide a stronger basis for tumor reversion as a biological process that ultimately would lead to the discovery of additional targets for the treatment of cancer. We described three sets of experiments. In the first one, biological models of tumor reversion were derived from three solid tumor cell lines. In the second, we asked the question of whether TCTP is a target protein by analyzing its capacity to modify the malignant phenotype in the framework of the experiments describing flat revertants, which initiated the whole field of tumor reversion (6). In the last set of experiments, we showed pharmaceutical agents reducing the level of TCTP and killing tumor cells.

We initiated our work on tumor reversion by asking the question of whether human leukemia cells would have the capacity to revert. In an earlier paper (1), we described these revertants, derived from the human erythroleukemia cell line K562. These KS cells (K562 Suppressed) were selected by using as a tool the H1 parvovirus that kills preferentially the tumor cells while sparing their “normal counterparts” (21, 23). These normal counterparts were unique cells among the leukemia cells (a frequency of 10^{-5} to 10^{-6} in further experiments). There was not a single sign of terminal differentiation and almost no spontaneous apoptosis (<1%) in the KS clones analyzed. However, they were not normal cells at all, the KS having an abnormal number of chromosomes and other molecular abnormalities found in this kind of tumor (1). They just lost their tumorigenicity. These experiments later were reproduced by deriving other revertants from the monocytic leukemia cell line U937. Here, too, the rate of reversion was very low, and no terminal differentiation was detected (2). Later, we derived revertants from solid tumors in the breast cancer cell lines, BT20, T47D, and MDA-MB231 (4).

We suggested then that tumor reversion is a biological process, with the capacity to override the oncogenic events to yield revertant cells. Some of these revertants lost almost their entire capacity to grow in soft agar and to form tumors after injection into *scid/scid* mice. In the revertants described in the present study and derived from colon, lung, and melanoma cell lines, we found the same characteristic loss of the malignant phenotype, with some of the clones barely growing. Because both the K562- and U937-derived revertants (KS and US) continued to produce H1 parvovirus, we thought that expression of the viral proteins was necessary for maintaining pressure on the cells, which would lead to a suppressed malignant phenotype. We were surprised to observe that in the revertants derived from the breast cancer cell lines (4) only one (MDA-MB231S) continued to produce the virus. This finding also seems true for the colon and lung revertants, where only one of the two revertant clones from lung and both colon revertants continued to produce the H1 parvovirus, whereas the melanoma-derived revertants did not produce

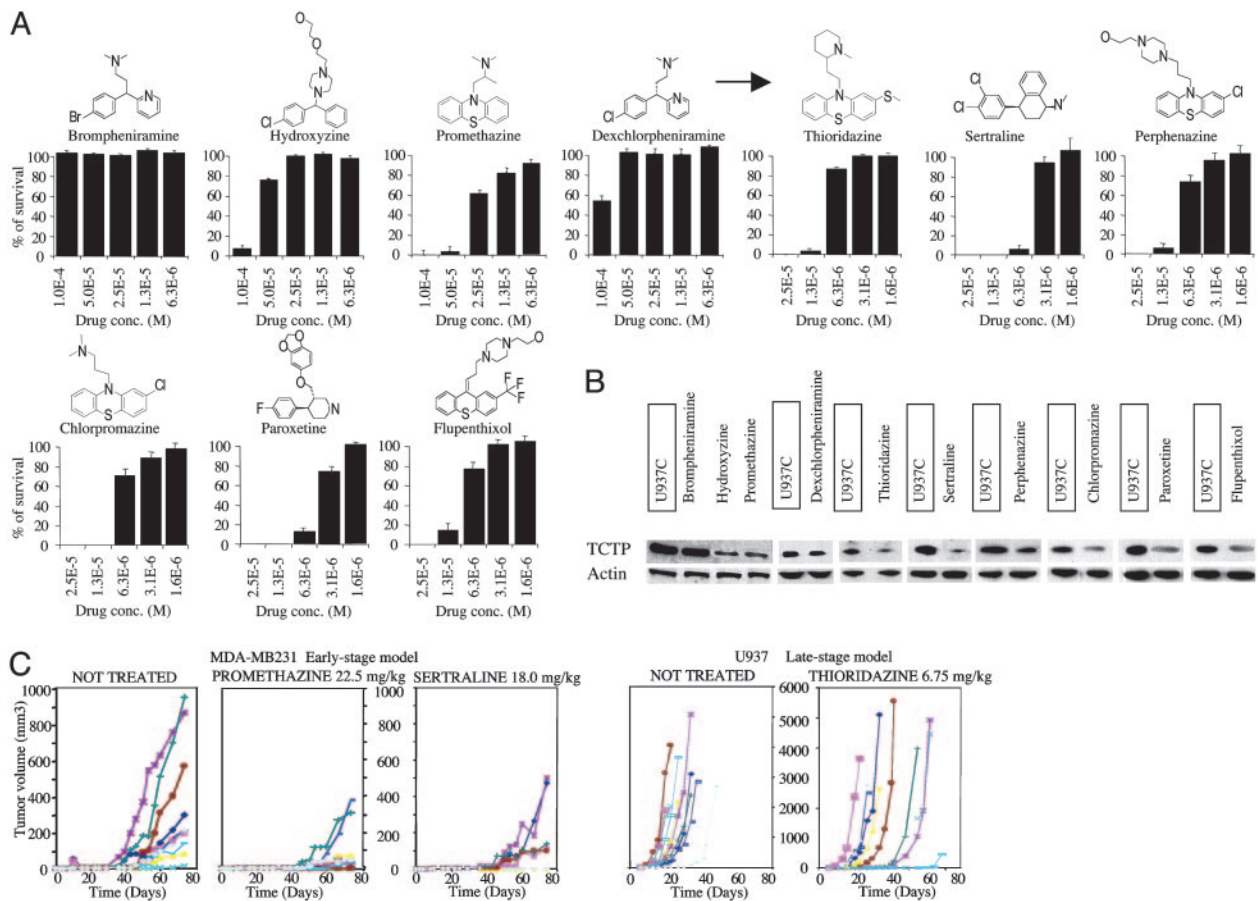


Fig. 3. Pharmacological compounds killing tumor cells and decreasing TCTP level. (A) U937 cell plus control solvent viability at different concentrations of the indicated drug, expressed as percentage of survival after 6 days of treatment. The arrow indicates a second generation of compounds. (B) Western blots showing TCTP expression in U937 cells after drug incubation (U937 plus control are boxed). (C) *In vivo* tumor formation in *scid/scid* mice during drug treatment. (Left) MDA-MB231 treated with promethazine or sertraline by using an early-stage protocol. (Right) U937 treated with thioridazine by using a late-stage protocol. (Each curve represents the tumor formation in a different mouse.) Treatment with promethazine or sertraline for the early stage models and thioridazine for the late-stage models results in a highly significant tumor-growth delay, with some of the animals treated displaying no tumor growth at all anymore.

it at all. These experiments led us to conclude that continuous infection with H1 parvovirus is not mandatory for maintaining the suppressed phenotype. H1 parvovirus functions as a selective agent with some clones continuing to produce it, whereas others did not produce it at all; this presence of H1 parvovirus does not change the parameters of the reversion. It remains possible, however, that during the selection procedure the virus induces the reversion process.

With a large-scale screening analysis (4) for the differentially expressed genes between the parental tumor cells and the revertants, among the 263 candidates, TCTP had the most striking differential expression. In MEGASORT analysis, the results showed 248 signals for TCTP detected in the malignant cell line U937, but only two signals in the revertant US4 cells. This differential expression for a gene is the strongest we have ever detected. Further experiments showed that the down-regulation of TCTP by antisense cDNA or RNA interference induces an increase of apoptosis in U937 cells (up to 15%) but, most strikingly, leads to the reorganization of the breast cancer cell into ductal/acinar structures (22).

The analysis of the primary sequence of TCTP, so far, does not lead to any possible interpretation of its function. The NMR structure of the *Schizosaccharomyces pombe* TCTP has been reported (16). The DALI search for homologous protein folds detected mainly two structural homologs, the guanine nucleotide exchange factor Mss4 and the MsrB peptide methionine sulfox-

ide reductase (Msr) fragment pilB (24). The guanine nucleotide-free chaperone Mss4 and its yeast homologue, Dss4, interact with the transient GDP/GTP-free form of the Rab. The Rab binding site on MSS4 coincides with the regions of highest sequence conservation in the TCTP family. The structural homology with the methionine-R-sulfoxide reductase (MsrB) is at the level of two antiparallel β sheets. Msrs protect against oxidative damage: Msr domains (MsrA and MsrB) of the pilB protein from *Neisseria gonorrhoeae* each reduce different epimeric forms of methionine sulfoxide. The structural homology between TCTP and pilB allows us to propose that the surface-exposed face of the four-stranded β sheets may constitute the site of interaction between TCTP and its biological partners. However, none of the amino acids located in pilB putative active site are structurally conserved in TCTP, and therefore no further biological insight can be revealed.

We confirmed that TCTP is down-regulated in one of the two colon cancer revertants, one of the two lung cancer revertants, and all of the melanoma revertants. Together with the KS (4) there are thus only three revertant clones where TCTP is not down-regulated. This finding makes sense because the analysis of tumors directly derived from patients also shows an increase of TCTP in most of the cancers analyzed, although not in all of them (4). These results suggest that all of the pathways of reversion would not involve the inhibition of TCTP. The decrease in TCTP level in most of the revertants together with the

antisense experiments in U937 cells and the reorganization experiments with RNA interference in breast cancer cells argue in favor of TCTP being a reasonable target for reversion.

To validate TCTP as a target we went back to similar experiments as the ones carried out in the mid-1960s where flat revertants of NIH3T3-transformed cells were, for the first time, identified. The data presented in this article suggest that down-regulation of TCTP by antisense induces a high amount of flat revertants in v-src-transformed NIH3T3 cells and strengthens the idea that TCTP is a valuable target for tumor reversion.

We have described the effect of pharmacological compounds on decreasing the level of TCTP and killing cancer cells. Because TCTP corresponds to HRF and because it has to be down-regulated to induce tumor reversion, we hypothesized that this effect could be mimicked by using antihistaminic drugs. Hydroxyzine is part of the piperazines, and promethazine is part of the phenothiazines. They both are antihistaminic by antagonizing the H1 receptor and also act on the CNS. The role of histamine in its antitumor activity is controversial. Promethazine inhibits the effect of histamine on endotoxins against certain solid tumors (25). Another report suggests that certain H1 antagonists increase the growth rate of melanoma and fibrosarcoma cell lines (26). In any case it is now well documented by animal studies and clinical data that H1 receptor antagonists do not promote tumor formation (27). We found that structurally related drugs, whether neuroleptics or antidepressive agents, have a cytophatic effect on U937 and MDA-MB231 cells. Antihistaminics and neuroleptics are widely used in patients with cancer, as antiallergic, antidepressive, or antiemetic agents. Their use, as a potentially effective single anticancer agent, is not well established in clinical assays. *In vitro* studies have revealed that some phenothiazines, including promethazine, thioridazine, perphenazine, and chlorpromazine, had an antiproliferative effect (28–30).

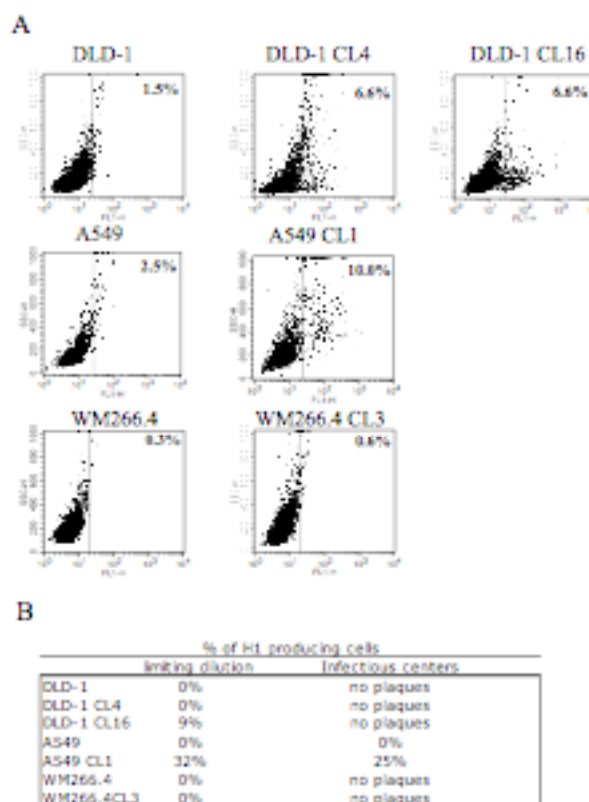
Thioridazine inhibits cell growth of MCF7 and MDA-MB231 tamoxifen-resistant cells (31), by blocking p170mdr-1 (32). Phenothiazines act either on H1 or dopamine receptors. Here, we propose that, at least in part, these drugs act through down-regulation of TCTP at the protein level. The fact that the mRNA level of TCTP is up-regulated by sertraline and thioridazine indicates that the transcription machinery is unaffected and may compensate for the diminution of TCTP. The drugs used at the concentration described here, which is high, do not induce in the mice any general signs of toxicity but kill the cancer cells and delay tumor formation. The fact that in one of the protocols we started the treatment 2 days before inoculating the tumor cells and that such an approach results in decreased tumor formation may suggest that these drugs could have a preventive effect on tumor formation. Whether TCTP is a direct or an indirect target of these drugs remains to be investigated. The most simple explanation would be provided if the drugs directly bind TCTP. However, it is equally important to know whether these drugs affect TCTP indirectly by, for example, acting on some of the TCTP interactor proteins. In such a situation the function or subcellular distribution of TCTP would be modified, which could ultimately lead to a significant decrease in TCTP levels.

In conclusion, our approach, which identified TCTP as a key player in the process of tumor reversion, also leads to the identification of a series of pharmaceutical compounds able to diminish its expression and kill malignant cells. This strategy may contribute to new alternatives in cancer treatment.

We thank Françoise Rohfritsch for technical assistance; David Hangauer and Werner Bollag for precious advice and providing an additional list of compounds after our first experiments with antihistaminic drugs; Franck Sturtz for his help and support during the entire study; Philippe Genne for carrying out the animal studies; and Pierre Chardin for helpful discussion and the v-src plasmid.

1. Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J. & Amson, R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8702–8706.
2. Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J. P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9039–9042.
3. Roperch, J. P., Alvaro, V., Prieur, S., Tuynder, M., Nemani, M., Lethrosne, F., Piouffre, L., Gendron, M. C., Israeli, D., Dausset, J., *et al.* (1998) *Nat. Med.* **4**, 835–838.
4. Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. & Telerman, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14976–14981.
5. Nilausen, K. & Green, H. (1965) *Exp. Cell Res.* **40**, 166–168.
6. Pollack, R. E., Green, H. & Todaro, G. J. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 126–133.
7. Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R. H. & Ikawa, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 162–166.
8. Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. & Noda, M. (1989) *Cell* **56**, 77–84.
9. Yenofsky, R., Bergmann, I. & Brawerman, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5876–5880.
10. Bohm, H., Gross, B., Gaestel, M., Bommer, U. A., Ryffel, G. & Bielka, H. (1991) *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 1193–1203.
11. Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. & Brawerman, G. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 2350.
12. Sanchez, J. C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M. R., James, R., Deshusses, J. & Hochstrasser, D. (1997) *Electrophoresis* **18**, 150–155.
13. Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. & Bommer, U. A. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 1257–1271.
14. Bommer, U. A. & Thiele, B. J. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 379–385.
15. MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J. & Lichtenstein, L. M. (1995) *Science* **269**, 688–690.
16. Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P. & Craven, C. J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 701–704.
17. Amzallag, N., Passer, B. J., Allanic, D., Segura, E., Thery, C., Goud, B., Amson, R. & Telerman, A. (September 21, 2004) *J. Biol. Chem.*, www.jbc.org/cgi/reprint/M404850200v2.
18. Cans, C., Passer, B. J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13892–13897.
19. Langdon, J. M., Vonakis, B. M. & MacDonald, S. M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1688**, 232–236.
20. Toolan, H. W. & Ledinko, N. (1968) *Virology* **35**, 475–478.
21. Mousset, S. & Rommelaere, J. (1982) *Nature* **300**, 537–539.
22. Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C. & Bissell, M. J. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 231–245.
23. Toolan, H. W., Rhode, S. L., III, & Gierthy, J. F. (1982) *Cancer Res.* **42**, 2552–2555.
24. Holm, L. & Sander, C. (1996) *Science* **273**, 595–603.
25. Bloksma, N., van de Wiel, P., Hofhuis, F., Kuper, F. & Willers, J. (1984) *Cancer Immunol. Immunother.* **17**, 33–37.
26. Brandes, L. J., Warrington, R. C., Arron, R. J., Bogdanovic, R. P., Fang, W., Queen, G. M., Stein, D. A., Tong, J., Zaborniak, C. L. & LaBella, F. S. (1994) *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 770–775.
27. Hardman, J. G. & Limbird, L. E., eds. (1996) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (McGraw-Hill, New York).
28. Strobl, J. S., Kirkwood, K. L., Lantz, T. K., Lewine, M. A., Peterson, V. A. & Worley, J. F., III (1990) *Cancer Res.* **50**, 5399–5405.
29. Gil-Ad, I., Shtaf, B., Levkovitz, Y., Dayag, M., Zeldich, E. & Weizman, A. (2004) *J. Mol. Neurosci.* **22**, 189–198.
30. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y. & Baba, Y. (2004) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**, 267–275.
31. Strobl, J. S. & Peterson, V. A. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 186–193.
32. Yu, D., Liu, B., Jing, T., Sun, D., Price, J. E., Singletary, S. E., Ibrahim, N., Hortobagyi, G. N. & Hung, M. C. (1998) *Oncogene* **16**, 2087–2094.

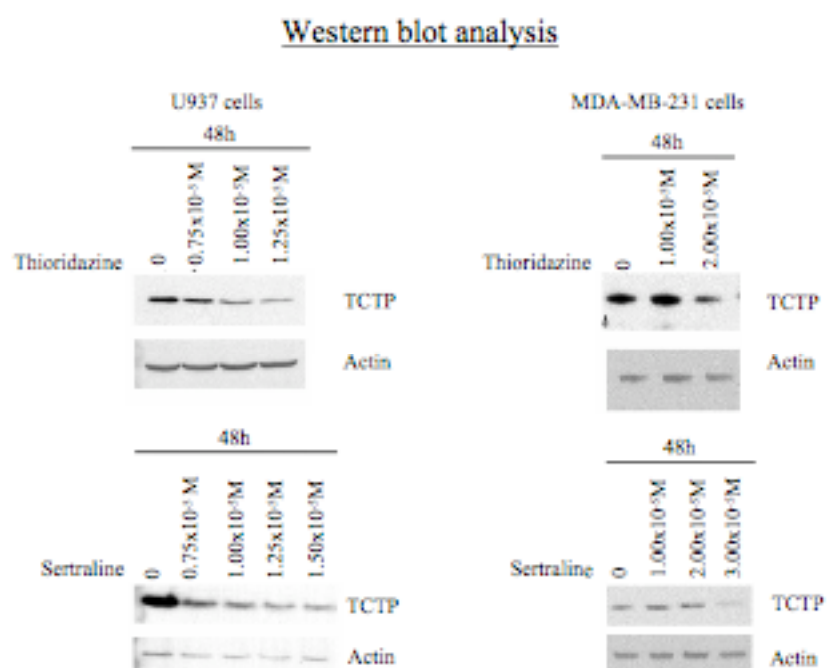
Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 4

H1 parvovirus detection. (A) Fluorescence-activated cell sorting analysis to detect the H1 parvovirus expression in tumor and revertant cells. The tumor cells DLD-1, A549, and WM266.4 and their isolated revertants were fixed and permeabilized according to the FIX et PERM protocol (Caltag, South San Francisco, CA). Cells were stained with an anti-H1-virion antibody revealed with anti-rabbit Alexa Fluor 488 and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson). (B) Percentage of H1-producing cells analyzed by limiting dilution and by infectious center assays. After limiting dilution, cells were grown for 1 week, and supernatants were incubated with SV40-transformed newborn human kidney cells for 5 days and scored for lysed NBE cells. In the infectious centers assay, tumor and revertant cells were seeded on NBE indicator cells and overlaid with medium containing agar (BactoAgar, Difco). Plaques were scored after 5 days with neutral red and corrected for plating efficiency.

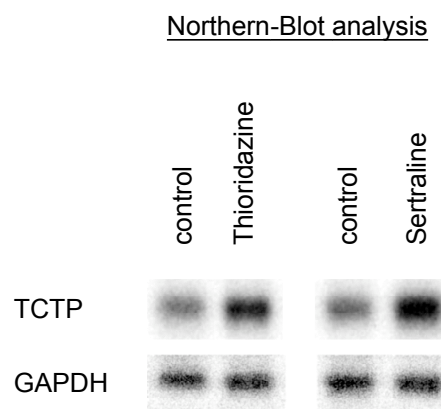
Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 5

Expression level of TCTP in U937 and MDA-MB-231 cells after treatment with the indicated concentrations of sertraline or thioridazine.

Supporting figures, which were published as supporting information on the PNAS web site.



Supporting Figure 6

Thioridazine and sertraline induce increased TCTP mRNA levels. Northern-Blot analysis from U937 cells after 18 h of incubation with 1×10^{-5} M sertraline and thioridazine. Solvents of drugs were used as controls. Blots were hybridized with a TCTP coding sequence probe. GAPDH was used as control for equal loading.

