



**HAL**  
open science

# Etude des interactions protéine-protéine par double hybride bactérien : applications en agro-alimentaire et en santé.

Marie-Laure Gervais

## ► To cite this version:

Marie-Laure Gervais. Etude des interactions protéine-protéine par double hybride bactérien : applications en agro-alimentaire et en santé.. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00555532

**HAL Id: tel-00555532**

**<https://theses.hal.science/tel-00555532>**

Submitted on 13 Jan 2011

**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.

**ETUDE DES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE  
PAR DOUBLE HYBRIDE BACTERIEN :  
APPLICATIONS  
EN AGRO-ALIMENTAIRE ET EN SANTE.**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

ECOLE DOCTORALE Végétal, environnement, nutrition, agroalimentaire, mer.

Présentée et soutenue publiquement

le : 21 mai 2010

à : Angers

par : **Marie-Laure GERVAIS**

Devant le jury ci-dessous :

**Mr GOUILLEUX Fabrice** (rapporteur, directeur de recherche, université de Tours)

**Mr EL AMRANI Abdelhak** (rapporteur, maître de conférence, université de Rennes)

**Mr LELIEVRE Eric** (examinateur, maître de conférences, université d'Angers)

**Mr LIMAMI Anis** (examinateur, professeur, université d'Angers)

**Directeur de thèse : LELIEVRE Eric**

UMR A\_191

2, boulevard Lavoisier

49045 ANGERS CEDEX 01

ED (N°) 495



Je, soussigné (e) .....,  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur GOUILLEUX et Monsieur EL AMRANI d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à examiner ce travail.

Je remercie vivement Monsieur GOUILLEUX de nous avoir accueillis dans son laboratoire en 2006 et de l'aide intellectuelle et matérielle qu'il m'a apporté pour la compréhension et la mise en place du double hybride bactérien à Angers.

Je remercie Anis LIMAMI et Olivier LEPRINCE de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire durant ces quelques années.

J'adresse également ma reconnaissance à Olivier COQUERET pour m'avoir accordé de son temps et les moyens nécessaires à ce projet ainsi que pour les différentes connaissances qu'il a pu m'apporter.

Je remercie chaleureusement Eric pour tout ce qu'il m'a apporté durant toutes ces années. Parmi les quelques personnes qui ont influé sur ma vie, il conserve une place primordiale. Je le remercie de m'avoir laissé prendre des initiatives, être autonome, tout en étant toujours à l'écoute de mes questions et de mes réflexions. Merci pour son soutien, pour la confiance sans borne qu'il m'a accordé ; depuis 5 ans, merci de m'avoir encouragé dans les périodes difficiles, d'avoir dépassé nos différents ponctuels et de m'avoir permis de m'accomplir professionnellement. Merci de m'avoir proposé ce projet aux multiples facettes, puis de l'avoir défendu du début à la fin ; j'ai aimé cette diversité intellectuelle et technique.

La thèse est une aventure particulière. Je suis fière d'avoir quotidiennement réussi à avancer, malgré les obstacles. Au-delà de tout ce qu'elle m'a enseigné sur le plan scientifique, cette aventure est associée à tous ceux, qui, souvent bien malgré eux, y ont participé. Ces 3 dernières années n'auraient pas eu la même saveur sans eux. « Je n'ai jamais rencontré d'homme si ignorant qu'il n'eut quelque chose à m'apprendre. » Galilée.

A toute l'équipe de MORE, Claudie, Elisabeth, Maric, Hussein, Caroline, et en particulier à Laure et Christine, qui ont réussi à me supporter dans les bons et les mauvais moments, des rires aux crises de nerfs devant ma paillasse. Un grand merci à Laure, toujours à l'écoute, pour m'avoir initié à la biologie moléculaire il y a 5 ans déjà, je suis heureuse de pouvoir lui rendre la pareille aujourd'hui.

Je remercie mes collègues du côté obscur de la force, les pathologistes, Nelly, Pascal, Bruno et Stéphanie pour toute leur aide et leur soutien. A Claire pour son aide en production et purification. A Philippe et Thomas, pour m'avoir montré qu'une levure, ce n'est pas une bactérie et pour leurs précieux conseils en général. J'ai une pensée particulière pour Benoît et Aymeric : de steak et frites à World overcraft, vous m'aurez bien fait triper : un monde parfois très étrange s'est ouvert à moi. Merci d'avoir si souvent trouvé tant de côtés positifs à tout ça.

Je n'oublie pas toute l'équipe de l'ARES, en particulier Michaela, Johann, Julia et Pascale. Bien que nous ayons eu peu de contacts, ils ont toujours été agréables et enrichissants. Je remercie beaucoup William et ses blagues que souvent je ne comprenais pas. Ne change rien, j'adore ton côté décalé.

Il n'est pas chose aisée de s'intégrer dans une équipe quand on ne fait que passer. J'ai eu la chance d'être si bien accueillie par toute l'équipe du centre Paul Papin. Merci à Catherine, Andreea, Sof, Chacha, Muriel, Anthony, Alice, Laure, Audrey et toute la pharmaco. Leur gentillesse durant ces 5 dernières années a grandement amélioré tous ces allers-retours. Je ne peux omettre les morues. Emilie : merci. Hélène : merci. Sandy : merci.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes maîtres Jedi, Julia, Sandrine et Gaëlle. Merci de votre patience lors de mes débuts, souvent chaotiques. Merci surtout à Juju, non pas pour avoir jeté mes flasques le lundi matin, mais pour avoir fait en sorte de ne plus avoir à les jeter. Merci aussi pour tout ce que tu as apporté au labo, pour m'avoir intégrée, m'avoir enseigné, pour ta joie de vivre et tes petits délires qui pour moi ont imprégné le labo et sont associés à la recherche. Je n'oublie pas toutes nos discussions scientifiques et personnelles, sérieuses...ou pas.

Je remercie mes amis, Jessy, Richard, Juliette, Melissa, Emilia, Lucie, Freddy, Lydie, Etienne, Elise et Fabrice, qui sont là depuis 6 ou 10 ans, malgré vents et marées, avec qui j'ai partagé d'inoubliables moments. Leur soutien a été inconditionnel, leur tolérance à mes absences répétées exemplaire. Vous m'avez régulièrement rappelé qu'une autre vie se déroulait hors du labo.

Merci à Ludo, à Hélène, Caro et Laetitia, à Céline et Julie et à toute la jam's team, qui m'ont apporté bien plus qu'ils ne l'imaginent. Merci pour tous ces moments partagés ensemble. De très très belles rencontres.

Un petit mot pour ma voiture qui a tenu le coup. Au-delà des nombreuses pannes, elle a roulé presque tous les jours avec la pêche. Merci à mon mécano de papa. 16j 16h.

Un grand merci à P'tit Dino, Ernoux, Courapied et Laurent. A tous nos vendredi soirs estampillés cointropolitain et blue lagoon, synonymes de rires, détentes et grandes discussions de haut niveau intellectuel. Merci aux morues pour tous nos délires, pour leur soutien et leur écoute, pour toutes ces heures passées ensemble à discuter, à chanter, à critiquer, à réfléchir sur les tampons, les systèmes d'incubation, et pléthore de sujets tout aussi importants. A nos mini weekends avec petit déjeuners. A p'tit Dino et son côté très légèrement maniaque, fais attention à toi et bonne nuit. A Ernoux qui ne répond jamais au téléphone, promis, je ne te fais plus de blagues. A Courapied et son sens de l'organisation et du timing, je ris encore en pensant à notre petite semaine de vacances chez Georges. A vous 4 : courage ! Restez zen.

Parmi mes amis je tiens à réserver une place particulière à Sabine et Céline. A Sabine avec qui j'ai régulièrement explosé mon forfait et chez qui je me suis fréquemment incrusté, merci de m'avoir écouté de très longues heures, d'avoir partagé ces dernières années. Fais preuve de créativité car c'est le jeu ma pauvre Lucette ! A Céline et à toutes nos soirées loose, tous nos weekends à l'arrache, nos vacances extrêmement bien préparées, aux cinés, aux samedis shopping, aux journées golf, thalasso, roller, vélo, match de ping pong et autres, à nos divagations, à nos ennuis, petits et grands. Merci de m'avoir fait tant profiter d'Angers au cours de ces 5 dernières années et d'avoir essayé de comprendre.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour avoir toujours été derrière moi. A ma sœur et son mari qui m'ont soutenu. A mes nièces, petits bouts de bonheur brut qui se dandinent. A mes parents surtout : merci d'avoir cru en moi, de m'avoir permis d'aller au bout de mes choix, sans restriction, merci pour m'avoir donné cette vie si diverse, notamment pour l'immense chance que j'ai eu il y a 20 ans qui m'a procuré une ouverture d'esprit sans nulle autre comparaison. Aujourd'hui encore je découvre tout ce que m'apporte cette période de ma vie. Merci pour votre soutien inconditionnel, je ne serai pas ce que je suis sans ce que vous m'avez offert. Je vous aime.

## ABREVIATIONS

3-AT : 3-amino-1,2,4-triazole

9AA : 9-aminoacridine

aa : acide aminé

aadA : gène de résistance à la streptomycine

AAV : « adeno-associated virus type 2 »

ABA : acide abscissique

ABF : facteur de liaison aux séquences ABRE ("ABRE binding factor")

ABR1 : facteur de réponse à l'éthylène

ABRE : élément de réponse à l'ABA "ABA Responsive Element"

ACC : précurseur de l'éthylène

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANGPTL4 : « Angiopoietin-related protein 4 »

APC : « Adenomatous Polyposis Coli »

APRF : facteur de réponse de phase aigüe ("acute-phase response factor")

Atg5 : protéine autophagique 5

ATM : "Ataxia-telangiectasia-mutated"

BET : bromure d'éthyldium

BFP/CFP/GFP/YFP : "blue/cyan/green/yellow fluorescent protein" (protéines fluorescentes)

BiFC : fluorescence par complémentarité bimoléculaire

BRET : transfert d'énergie par résonance de fluorescence

BSA : albumine du sérum bovin ("bovine serum albumin")

bZIP : "basic leucine zipper"

CDK4 : "cyclin-dependent kinase 4"

CDKN1A : "cyclin-dependent kinase inhibitor 1A"

CE3 : "coupling-element-like sequence"

CKI : "cyclin-dependent kinase inhibitor"

CTD : domaine carboxy-terminal ("carboxy terminal domain")

CTLA4 : antigène cytotoxique 4 des lymphocytes T

DBD : domaine de liaison à l'ADN

DDB1/2 : protéine de liaison à l'ADN spécifique des dommages de l'ADN 1/2

DNMT1 : DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1

ECL : “enhanced chemiluminescence” : détection améliorée de la chimiluminescence”  
EDF1 : “Endothelial differentiation-related factor 1”  
EGFR : récepteur du facteur épidermique de croissance  
ERF : facteur de réponse à l'éthylène  
E $\alpha$  : récepteur alpha de l'œstrogène  
EST : marqueurs de séquences exprimées ("expressed sequence tags")  
Ets-1 : "v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1"  
Fc : fragment cristallisable d'un anticorps (partie constante)  
FOXO1 : « Forkhead box O1 »  
FRET : transfert d'énergie par résonance de fluorescence  
FT : facteur de transcription  
GA : acide gibbérellique ("giberellic acid")  
GID1 : récepteur de l'acide gibberellique ("gibberellin-insensitive DWARF1")  
HDAC : histone déacétylase  
HIF-1 $\alpha$  : facteur hypoxique inductible 1 $\alpha$  ("hypoxia-inducible factor")  
HSP : protéine de choc thermique ("Heat Shock Protein")  
IGF-1 : facteur de croissance insulinique 1  
Il-1  $\beta$  /-6 : interleukine-1 $\beta$ /-6  
IPTG : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
JAK : “Janus-activated kinase”;  
JAP : jour(s) après pollinisation  
LEA : "Late Embryogenesis Abundant Protein"  
LEC1/2 : "leafy cotyledons 1/2"  
LUMIER : « LUminescence-based Mammalian IntERactome »  
MAP kinase : protéine kinase d'activation mitogénique ("mitogen-activated protein kinase")  
MAPPIT : « MAMmalian Protein-Protein Interaction Trap »  
MMLV-RT : “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”  
MtSAP1 : "Medicago truncatula Stress-Associated Protein 1"  
NER : réparation par excision de nucléotide  
NF-kB : “nuclear factor-kappa B”  
OsiSAP1 : "*Oryza sativa* stress-associated protein 1"  
PBS : tampon phosphate salin  
pBT : plasmide appât  
PCNA : antigène nucléaire de prolifération cellulaire

PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PHB2/REA/BAP37 : prohibitine 2 ("prohibitin 2/receptor of estrogen antigen/B-cell activated protein 37")  
PI3K : phosphoinositide-3-kinase"  
P-LISA : « Proximity Ligation in Situ Assay »  
protein -/- ou souris KO : souris dont les 2 allèles du gène codant la protéine sont annihilés.  
pTRG : plasmide cible  
pTRG-XR : plasmide cible prédigéré  
PVDF : polyfluorure de vinylidène  
rATP : ribose adénosine triphosphate  
Rb : protéine du rétinoblastome  
RNAi : ARN interférentiel  
ROS : composés réactifs de l'oxygène ("reactive oxygen species")  
RPL13/18/29/S2 : protéine ribosomale 13/18/29/S2  
SAP : protéine associée au stress (stress-associated protein")  
SDS-PAGE : électrophorèse par gel d'acrylamide en conditions dénaturantes ("sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis")  
SOCS1 : suppresseur de la signalisation des cytokines 1  
SOD: superoxyde dismutase  
SSeCKS : « src-suppressed C-kinase substrate »  
SSH : hybridation suppressive et soustractive  
STAT : transducteur de signal et activateur de la transcription  
StMBF1 : "Solanum tuberosum multibridging factor 1"  
SV40 : « Simian Virus 40 »  
SVF : sérum de veau fœtal  
TBP : protéine de liaison à la TATA box.  
TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant beta  
TNF $\alpha$  : facteur de nécrose tumoral alpha ("tumor-necrosis factor alpha")  
UPR : "Unfold Protein Response"  
USP : "Ubiquitin-Specific Proteases"  
VEGF : facteur de croissance épithélial vasculaire  
Western Blot (WB) : SDS-PAGE suivie par une immunoempreinte.  
 $\alpha$ RNApol : sous unité alpha de l'ARN polymérase  
 $\lambda$ cI : répresseur du bacteriophage lambda

# SOMMAIRE

	page
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>9</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>17</b>
<u>I. Intérêt des interactions protéine-protéine.</u>	18
<u>II. Techniques d'études des interactions.</u>	23
1. Méthodes génétiques.	23
2. Méthodes biochimiques.	23
a. Techniques <i>in vitro</i> .	24
<i>i. Coimmunoprécipitation.</i>	25
<i>ii. Précipitation du complexe in vitro : « Pull down».</i>	26
<i>iii. Puces à protéines.</i>	27
b. Techniques <i>in vivo</i> .	29
c. Double hybride.	32
<i>i. Généralités.</i>	32
<i>ii. Double hybride chez la levure.</i>	32
<i>iii. Double hybride chez les mammifères.</i>	37
<i>iv. Double hybride chez les procaryotes.</i>	39
• Principe et utilisation dans la bibliographie.	39
• Avantages et inconvénients.	41
3. <u>Méthodes biophysiques et théoriques.</u>	42
<u>III. Applications en recherche clinique et industrielle.</u>	44
<u>IV. Contexte scientifique et objectifs de la thèse.</u>	46
<b>CHAPITRE 1 : LE DOUBLE HYBRIDE BACTERIEN</b>	<b>47</b>
<b><u>Principe.</u></b>	<b>48</b>
<b><u>Matériels et Méthodes.</u></b>	<b>49</b>

<u>I. Constructions du plasmide recombinant pBT.</u>	49
<u>II. Construction de la banque ADNc.</u>	50
1. Obtention des ADNc.	50
2. Fractionnement par taille des ADNc.	52
3. Transformation bactérienne des vecteurs recombinants pTRG.	52
4. Obtention de la banque.	52
<u>III. Faisabilité de la méthode.</u>	53
1. Vérification de la production recombinante.	53
2. Test de « self activation ».	54
a. Plasmides & milieux.	54
b. Cotransformation et analyse des résultats.	54
<u>IV. Crible de la banque d'ADNc.</u>	55
1. Crible.	55
2. Identification des ADNc.	55
a. Isolation du pTRG recombinant.	55
b. Identification par bioinformatique.	55
<u>V. Vérification des interactions.</u>	57
<u>VI. Applications.</u>	57
1. Constructions des plasmides recombinants pBT-séquences appât.	57
2. Faisabilité de la méthode.	59
3. Construction des plasmides recombinants pTRG-ADNc et cribles.	59
<b><u>Résultats.</u></b>	60
<u>I. Banque d'ADNc de lignée tumorale colorectale humaine.</u>	62
<u>II. Banque d'ADNc de graines sèches de <i>Medicago truncatula</i>.</u>	62
<b>CHAPITRE 2 : INTERACTIONS PROTEINIQUES : APPLICATION EN AGRONOMIE. EXEMPLE DE MtSAP1.</b>	63
<b><u>Avant-propos.</u></b>	64
<b><u>Introduction.</u></b>	65
<u>I. Vision générale.</u>	65
<u>II. Germination et stress.</u>	66
1. Tolérance à la dessiccation.	66
2. Dormance.	67
	10

3. Quiescence.	68
4. Germination.	68
5. Régulation de la maturation et de la germination.	69
a. Les hormones.	69
<i>i. L'acide abscissique.</i>	69
<i>ii. L'acide gibbérellique.</i>	70
<i>iii. Autres.</i>	70
b. Régulation moléculaire.	71
6. Stress abiotiques.	72
<b><u>III. Objectifs de l'étude.</u></b>	75
<b><u>Partie 1 : MtSAP1 : organisation et expression dans l'axe embryonnaire.</u></b>	76
<b><u>I. Introduction.</u></b>	76
<b><u>II. Article en soumission.</u></b>	78
<b><u>III. Conclusion.</u></b>	112
<b><u>Partie 2 : Double hybride de MtSAP1.</u></b>	114
<b><u>I. Introduction.</u></b>	114
<b><u>II. Double hybride de MtSAP1.</u></b>	114
1. Faisabilité.	114
a. Production recombinante de la protéine appât MtSAP1.	115
b. Test de « self activation ».	115
2. Crible de la banque par la protéine appât MtSAP1.	115
<b><u>III. Discussion et conclusion.</u></b>	121
<b>CHAPITRE 3 : INTERACTIONS PROTEINIQUES : APPLICATION EN SANTE.</b>	128
<b><u>Avant-propos.</u></b>	129
<b><u>Partie 1 : Double hybride de STAT3.</u></b>	132
<b><u>I. STAT3, facteur de transcription et puissant oncogène.</u></b>	132
1. La protéine STAT3.	132
2. STAT3, facteur de transcription.	134
a. Activation de STAT3.	134
b. Mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes cibles.	137
3. Fonctions de STAT3.	139
a. Conséquences de l'absence de STAT3.	139

b.	Implication de STAT3 dans l'inflammation.	139
c.	Implication de STAT3 dans la tumorigenèse.	139
i.	<i>Activation de STAT3 dans les tumeurs.</i>	139
ii.	<i>STAT3 module tous les aspects de la tumorigenèse.</i>	140
d.	STAT3 dans le microenvironnement tumoral.	144
4.	STAT3, une cible thérapeutique.	145
<b>II.</b>	<b><u>Double hybride de STAT3.</u></b>	147
1.	Faisabilité.	147
a.	Production recombinante de la protéine appât STAT3-Cter.	147
b.	Test de « self activation ».	147
2.	Crible de la banque par la protéine appât STAT3-Cter.	148
<b>III.</b>	<b><u>Discussion et conclusion.</u></b>	160
<b>Partie 2 :</b>	<b><u>Double hybride de p21.</u></b>	165
<b>I.</b>	<b><u>p21, un inhibiteur du cycle cellulaire aux rôles multiples.</u></b>	165
1.	Le gène et la protéine.	165
2.	p21 est un régulateur de la prolifération cellulaire.	167
a.	p21, inhibiteur des complexes cycline/cdk.	168
b.	p21, inhibiteur de la synthèse d'ADN par interaction avec PCNA, est impliqué dans la réparation de l'ADN.	170
c.	p21 est également un stimulateur de la prolifération cellulaire.	172
d.	Localisation cellulaire et implication dans la prolifération et l'apoptose.	172
e.	Régulation de p21.	174
i.	<i>Régulation transcriptionnelle de p21.</i>	174
•	Régulation dépendante de p53.	174
•	Régulation indépendante de p53.	174
ii.	<i>Régulation post-transcriptionnelle de p21.</i>	175
f.	Implication de p21 dans le cancer.	178
g.	Autres fonctions.	181
i.	<i>p21 &amp; sénescence.</i>	181
ii.	<i>p21 &amp; différenciation.</i>	183
iii.	<i>p21 &amp; autophagie.</i>	184
iv.	<i>p21 &amp; virus.</i>	185
h.	Conclusion.	187
<b>II.</b>	<b><u>Double hybride de p21.</u></b>	188

1. Faisabilité de la technique.	188
2. Crible de la banque d'ADNc humaine par p21.	189
<u>III. Discussion et conclusion.</u>	198
<b><u>Partie 3 : Interaction entre p21 et PHB2.</u></b>	202
<u>I. Etat actuel des connaissances sur la prohibitine 2.</u>	202
1. PHB2 & infection virale.	203
2. PHB2 & différenciation musculaire.	203
3. PHB2 dans la mitochondrie.	204
4. PHB2 est un régulateur des activités oestrogéniques.	205
5. Implication dans le cancer.	206
<u>II. Objectifs de l'étude.</u>	207
<u>III. Article en soumission (« short communication »).</u>	209
<u>IV. Résultats supplémentaires.</u>	228
1. Matériels et Méthodes.	228
a. Analyse de l'expression génique.	228
b. Analyse de l'expression protéique.	229
c. Traitements des cellules et analyse des westerns blots.	229
d. Transfection transitoire dans les cellules HEK293.	230
e. Test de clonogénicité.	230
f. FACS.	231
g. Immunofluorescence.	231
2. Résultats.	232
a. PHB2 et prolifération cellulaire.	232
b. PHB2 & p21.	236
3. Discussion.	239
<u>V. Conclusion.</u>	246
<b>DISCUSSION GENERALE.</b>	247
<b>CONCLUSIONS GENERALES &amp; PERSPECTIVES.</b>	262
<b>BIBLIOGRAPHIE.</b>	266
<b>ANNEXES</b>	295

## LISTE DES FIGURES

	page
<u>Figure 1</u> : Carte d'interaction protéinique de la drosophile.	20
<u>Figure 2</u> : Réseau d'interaction de p21 <sup>waf1</sup> .	22
<u>Figure 3</u> : Système P-LISA.	24
<u>Figure 4</u> : Coimmunoprécipitation.	25
<u>Figure 5</u> : Principe du "pull down".	26
<u>Figure 6</u> : Principe des puces à protéines.	28
<u>Figure 7</u> : Détection des interactions par fluorescence et bioluminescence.	30
<u>Figure 8</u> : Phage display.	31
<u>Figure 9</u> : Principe du double hybride de levure mis au point par Fields and Song.	33
<u>Figure 10</u> : Applications de la technique du double hybride.	36
<u>Figure 11</u> : Principe du double hybride de mammifère.	37
<u>Figure 12</u> : Systèmes de complémentation et de reconstitution dans les cellules de mammifères.	38
<u>Figure 13</u> : Principe du double hybride bactérien développé par Joung.	39
<u>Figure 14</u> : Détection des interactions protéine-protéine par méthodes biophysiques.	43
<u>Figure 15</u> : Principe du double hybride bactérien.	48
<u>Figure 16</u> : Synthèse de la banque d'ADNc.	51
<u>Figure 17</u> : Déroulement du crible de la banque d'ADNc.	56
<u>Figure 18</u> : Purification des ARNm.	60
<u>Figure 19</u> : Obtention des ADNc.	61
<u>Figure 20</u> : Estimation de la taille des ADNc de la banque.	62
<u>Figure 21</u> : <i>Medicago truncatula</i> .	64
<u>Figure 22</u> : Anatomie d'une graine.	65
<u>Figure 23</u> : Régulation de la germination.	70
<u>Figure 24</u> : Réponse cellulaire aux stress abiotiques.	73
<u>Figure 25</u> : MtSAP1- $\lambda$ cI est produite par les bactéries du système double hybride.	114
<u>Figure 26</u> : La production de la protéine appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.	115
<u>Figure 27</u> : Répartition des partenaires potentiels de MtSAP1 obtenus.	116

<u>Figure 28</u> : Répartition des partenaires potentiels de MtSAP1 obtenus en fonction des types de stress dans lesquels ils sont impliqués.	117
<u>Figure 29</u> : Modèle de fonctionnement de MtSAP1 en réponse aux stress abiotiques.	127
<u>Figure 30</u> : Cycle cellulaire.	130
<u>Figure 31</u> : Représentation tridimensionnelle du dimère STAT3.	133
<u>Figure 32</u> : Séquence primaire de STAT3, domaines et modifications post-traductionnelles.	135
<u>Figure 33</u> : Schéma global de la voie de signalisation de STAT3.	136
<u>Figure 34</u> : STAT3 module la transcription.	138
<u>Figure 35</u> : STAT3 favorise la transformation cellulaire et la progression tumorale.	143
<u>Figure 36</u> : Intérêt d'un traitement inhibiteur de STAT3.	146
<u>Figure 37</u> : STAT3-Cter- $\lambda$ CI est produite par les bactéries du système double hybride.	147
<u>Figure 38</u> : La production des protéines appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.	148
<u>Figure 39</u> : Répartition des partenaires potentiels de STAT3-Cter obtenus.	149
<u>Figure 40</u> : Répartition des partenaires potentiels de STAT3-Cter obtenus en fonction de leur activité cancéreuses (hypothétique ou démontrée).	150
<u>Figure 41</u> : Alignement des séquences primaires des orthologues de p21.	166
<u>Figure 42</u> : Séquence primaire, modifications post-traductionnelles et domaines de liaison de p21.	167
<u>Figure 43</u> : p21 régule la progression du cycle cellulaire.	169
<u>Figure 44</u> : Implication de p21 dans l'entrée en mitose.	170
<u>Figure 45</u> : Régulation transcriptionnelle de p21.	176
<u>Figure 46</u> : Protéolyse de p21 dépendante des ubiquitines lors d'un cycle physiologique.	177
<u>Figure 47</u> : Activité d'agents thérapeutiques sur p21.	180
<u>Figure 48</u> : p21- $\lambda$ CI est produite par les bactéries du système double hybride.	188
<u>Figure 49</u> La production des protéines appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.	189
<u>Figure 50</u> : Répartition des partenaires potentiels de p21 obtenus.	190
<u>Figure 51</u> : Répartition des partenaires potentiels de p21 obtenus en fonction de leur activité cancéreuses (hypothétique ou démontrée).	191
<u>Figure 52</u> : Séquence primaire de PHB2.	202
<u>Figure 53</u> : Cinétique d'expression transitoire de PHB2 transfectée dans HEK293.	232
<u>Figure 54</u> : Effet de la surexpression de PHB2 sur la prolifération cellulaire.	233

<u>Figure 55</u> : Surexpression de PHB2 et cycle cellulaire.	234
<u>Figure 56</u> : Effet sur l'expression de l'oncogène c-myc.	235
<u>Figure 57</u> : Immunolocalisation.	236
<u>Figure 58</u> : Effet de PHB2 et de p21 sur la prolifération cellulaire.	237
<u>Figure 59</u> : Inhibition du protéasome et expression de p21.	238
<u>Tableau 1</u> : Spécificités des clonages des séquences appât dans le plasmide pBT.	58
<u>Tableau 2</u> : Partenaires potentiels d'interaction avec SAP1 chez <i>Medicago truncatula</i> .	118
<u>Tableau 3</u> : Partenaires potentiels d'interaction avec le domaine de transactivation de STAT3.	151
<u>Tableau 4</u> : Partenaires potentiels d'interaction avec p21.	192

**INTRODUCTION**  
**GENERALE**

Le séquençage des génomes a été un projet majeur de la communauté scientifique lors de ces deux dernières décennies. L'un des premiers génomes séquencés est celui de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* achevé en 2000 [1] et c'est en 2003 que s'est achevé le projet de séquençage du génome humain [2]. Que ce soit dans le domaine agro-alimentaire ou dans le domaine de la santé, ces projets étaient porteurs de nombreux espoirs quant à la compréhension des mécanismes pathologiques au niveau cellulaire. Cependant, il s'est avéré que l'étude des gènes et de leurs modifications n'était pas suffisante dans la compréhension de nombreux états physiologiques et pathologiques et qu'il était indispensable de connaître et de comprendre les mécanismes protéiques mis en place pour appréhender ces phénomènes. Ainsi, depuis quelques années en recherche, le génome a laissé la place à son interprétation, le protéome. Par exemple, dans le cas des organismes *Homo sapiens* et *Arabidopsis thaliana*, on estime à ce jour qu'environ 500 000 protéines proviennent de 25 à 30 000 gènes. L'étude du protéome est donc plus complexe mais plus spécifique d'un état physiologique ou pathologique.

### I. Intérêt des interactions protéine-protéine.

« Si le génome est le code de la vie, les interactions protéiniques représentent le système de communication – l'internet de nos corps ». Le plus souvent, la fonction d'un gène se manifeste par l'activité de la protéine qu'il code. Par ailleurs, le taux d'ARN messager (ARNm) n'est pas toujours corrélé au taux de protéine correspondant et la fonction des protéines est rarement unique. Selon les stimuli initiaux, la surproduction, l'extinction ou l'activation d'une protéine induit des effets nombreux, synergiques ou même antagonistes. L'identification des complexes protéiques permet d'approfondir les différentes fonctions d'une protéine d'intérêt, voire d'appréhender sa fonction initiale lorsque celle-ci est totalement inconnue.

Les interactions protéine-protéine sont un aspect essentiel des processus biologiques. Elles sont fortement impliquées dans la formation de structures macromoléculaires, dans la signalisation, dans la régulation et dans les différentes voies métaboliques. Leur étude est donc cruciale pour la compréhension des réseaux d'interaction protéiniques, but majeur dans l'étude des systèmes biologiques. Les interactions protéine-protéine ont un rôle conséquent dans l'induction de beaucoup d'états pathologiques et dans les processus importants pour la pathogenèse des infections bactériennes et virales [4].

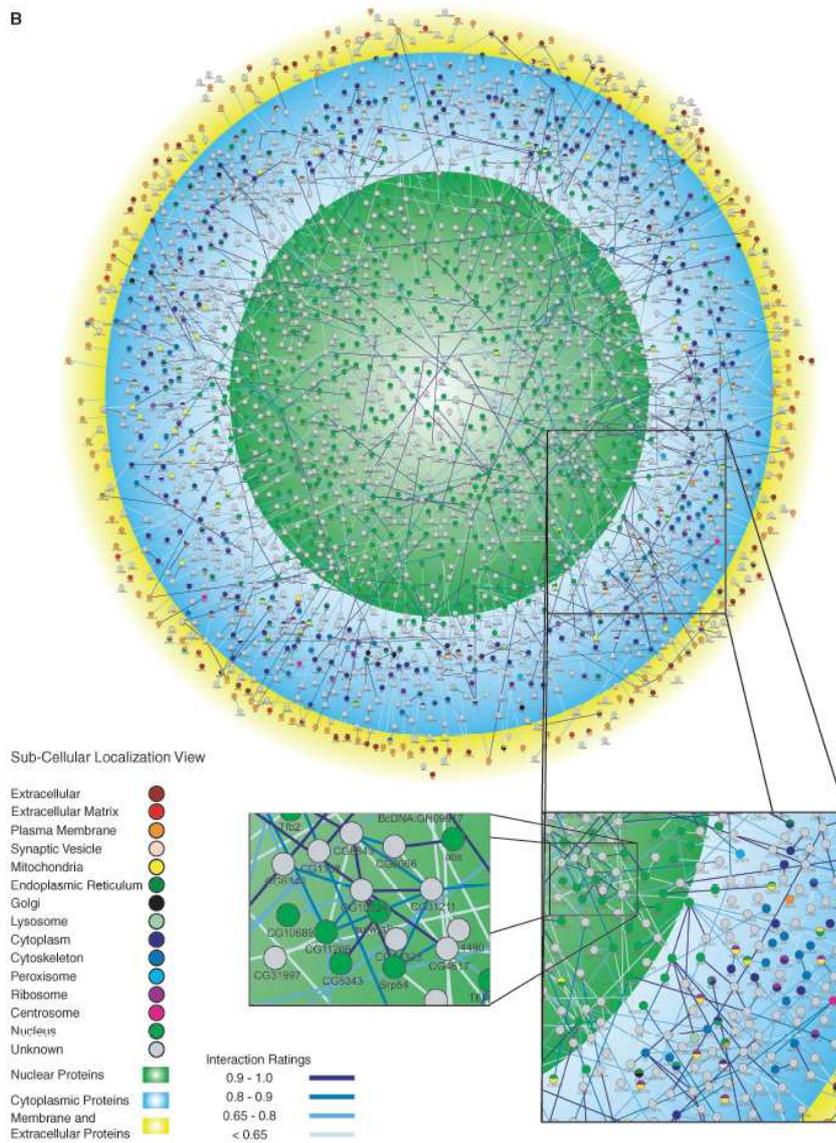
La haute spécificité de ces interactions fait d'elles des cibles idéales pour les agents thérapeutiques [5,6]. Dans certains cas, notamment chez les plantes, l'identification des interactions protéine-protéine est une étape critique dans la détermination des fonctions de protéines inconnues. En effet, l'absence d'outils technologiques comme une vaste collection d'anticorps ne permet pas dans certains cas d'étudier directement la fonction d'une protéine donnée.

Ce type d'étude a permis de construire pour un instant T une carte d'interactions d'un groupe fonctionnel de protéines [7], de petits protéomes [8] voire de protéomes plus complexes [3,9-12]. La figure 1 extraite des travaux de Giot *et al.* en 2003 sur l'interactome de la drosophile montre une vue globale du réseau d'interactions selon la localisation cellulaire.

La forte prédiction des relations fonctionnelles de protéines dont l'interaction a été montrée est importante pour l'annotation des gènes. Chez les végétaux, les protéines sont souvent définies uniquement par la traduction de séquence codante. Le séquençage partiel de génomes comme ceux du blé (*Triticum aestivum*, 17000 Mb) et du maïs (*Zea mays*, 2500 Mb), ou total des génomes de l'Homme (*Homo sapiens*, 3000 Mb), d'*Arabidopsis thaliana* (157 Mb), ou du riz (*Oryza sativa*, 430 Mb), n'a pas abouti à l'annotation fonctionnelle de chaque gène, notamment du à la complexité des génomes qui peuvent être jusqu'à hexaploïde (cas du blé). De plus, l'étude fonctionnelle des gènes dans un organisme ou un tissu donné ne donne pas des résultats toujours applicables aux protéines correspondantes.

La construction de carte d'interactions est donc un outil intéressant pour aider à l'annotation fonctionnelle des séquences génomiques d'organismes dont le génome est complexe ou peu étudié. Cette cartographie devient même indispensable aux études post-génomiques et il existe de nombreux sites internet recensant les interactions protéine-protéine démontrées et/ou hypothétiques : STRING [13], IntAct [14], MINT [15], BIND [16], iHOP [17], BioGRID [18] et DIP [19] en sont quelques exemples.

**Figure 1:** Carte d'interaction protéinique de la drosophile.



Chaque protéine est colorée selon son annotation génique ontologique. 2346 protéines et 2268 interactions sont représentées.

*Réf.*: [3] Giot, L., Bader J. S., *et al.* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* (2003) 302 : 1727-36.

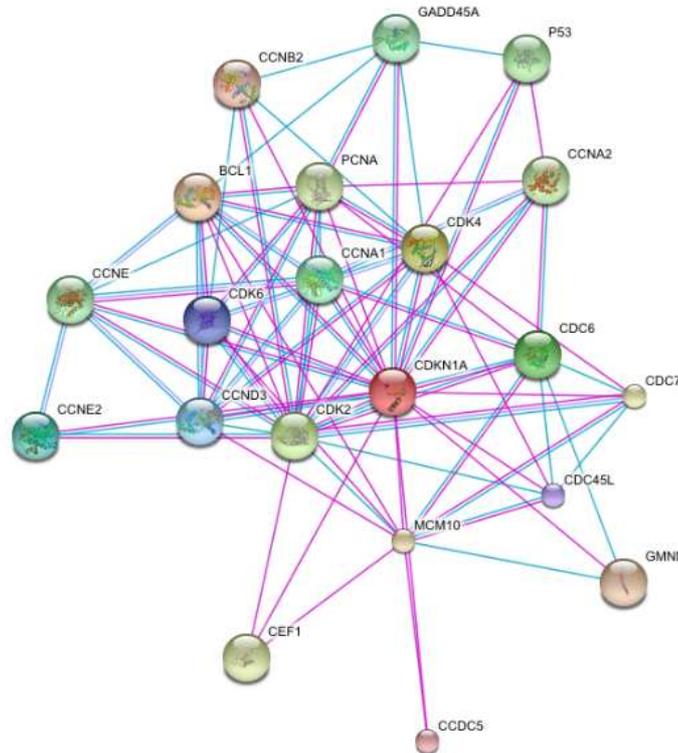
La figure 2 ci-contre présente un exemple des résultats obtenus après recherche sur la banque de donnée STRING 8.1 des interactions de la protéine humaine p21<sup>waf1</sup>. Par extension, des banques de données spécifiques des domaines d'interaction voient le jour grâce aux informations collectées par ces premières banques associées aux expérimentations, telles que InterDom [20], permettant de construire des réseaux d'interaction [21]. Avec l'essor des technologies d'études des interactions, ces données participent à la mise en place d'outils pour la construction de cartes de réseaux des réactions intracellulaires. Ces réseaux sont utiles pour la compréhension des voies protéiques mais aussi pour l'interprétation des données obtenues à partir des puces à ADN ou à protéines [22,23].

Toutefois, c'est l'augmentation des technologies d'études des interactions ainsi que leur perfectionnement qui reste primordial, puisque toute étude bioinformatique doit être validée par une étude expérimentale. Le nombre d'interaction entre protéines est considérable. L'exploration de ces réseaux protéiques complexes nécessite des méthodologies adaptées ainsi que des outils bioinformatiques puissants pour les analyser.

**Figure 2 :** Réseau d'interaction de p21<sup>waf1</sup>.

L'interface STRING 8.1 présente les 20 partenaires d'interaction de p21/waf1 recensées dans les banques de données et/ou vérifiées expérimentalement dont l'indice de confiance est le plus élevé.

Réf. : <http://string.embl.de/>



**Your Input:**

- CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) (CDK-interacting protein 1) (Melanoma differentiation-associated protein 6) (MDA-6); May be the important intermediate by which p53 mediates its role as an inhibitor of cellular proliferation in response to DNA damage. Binds to and inhibits cyclin-dependent kinase activity, preventing phosphorylation of critical cyclin-dependent kinase substrates and blocking cell cycle progression (164 aa) (*Homo sapiens*)

**Predicted Functional Partners:**

		Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	Homology	Score
● BCL1	G1/S-specific cyclin-D1 (PRAD1 oncogene) (BCL-1 oncogene); Essential for the control of the cel [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CDK4	Cell division protein kinase 4 (EC 2.7.11.22) (Cyclin-dependent kinase 4) (PSK-J3); Probably in [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CDK2	Cell division protein kinase 2 (EC 2.7.11.22) (p33 protein kinase); Involved in the control of [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CDC6	Cell division control protein 6 homolog (CDC6-related protein) (p62(cdc6)) (HsCDC6) (HsCDC18); [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CCNA1	Cyclin-A1; May be involved in the control of the cell cycle at the G1/S (start) and G2/M (mitos [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CCNE2	G1/S-specific cyclin-E2; Essential for the control of the cell cycle at the late G1 and early S [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CCND3	G1/S-specific cyclin-D3; Essential for the control of the cell cycle at the G1/S (start) transi [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CDK6	Cell division protein kinase 6 (EC 2.7.11.22) (Serine/threonine- protein kinase PLSTIRE); Proba [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.999
● CDC45L	CDC45-related protein (PORC-PI-1) (Cdc45); Required for initiation of chromosomal DNA replicati [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CCDC5	Coiled-coil domain-containing protein 5 (Enhancer of invasion-cluster) (HEI-C); Regulator of sp [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CCNB2	G2/mitotic-specific cyclin-B2; Essential for the control of the cell cycle at the G2/M (mitosis [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● GMNN	Geminin; Inhibits DNA replication by preventing the incorporation of MCM complex into prereplic [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● MCM10	Protein MCM10 homolog (HsMCM10); Proposed to be involved in DNA replication and to participate [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CDC7	Cell division cycle 7-related protein kinase (EC 2.7.11.1) (CDC7- related kinase) (HsCdc7) (huC [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CEF1	Cell division cycle 5-like protein (Cdc5-like protein) (Pombe cdc5- related protein); DNA-bindi [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin); This protein is an auxiliary protein of DNA [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CCNA2	Cyclin-A2 (Cyclin-A); Essential for the control of the cell cycle at the G1/S (start) and the G [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● P53	Cellular tumor antigen p53 (Tumor suppressor p53) (Phosphoprotein p53) (Antigen NY-CO-13); Acts [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.998
● CCNE	G1/S-specific cyclin-E1; Essential for the control of the cell cycle at the G1/S (start) transi [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.997
● GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 alpha (DNA- damage-inducible transcript 1 [...]	x	x	x	x	●	x	x	x	0.995

## II. Techniques d'études des interactions.

Les techniques présentées ici sont regroupées et détaillées dans une revue de Phizicky de 1995 [24] et dans une revue de Suter de 2008 [25].

### 1. Méthodes génétiques.

L'intérêt pour les interactions protéine-protéine a précédé les outils pour les étudier. La bonne connaissance de certains génomes comme celui de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Drosophila melanogaster* a permis d'étudier indirectement les interactions entre protéines via la génomique. Ces techniques sont basées sur la bonne connaissance des gènes codant les protéines d'intérêt et leurs mutations. La méthode des supresseurs extragéniques, de l'effet synthétique létal et de la non-complémentation dissociée (« unlinked noncomplementation ») [24] sont des méthodes *in vivo* basées sur un changement de phénotype et des mutations induisant des variations dans l'interaction protéine-protéine. Dans certains cas, une mutation sur la protéine Y compense une mutation sur la protéine X et restaure l'activité du dimère XY (suppresseurs extragéniques). De même, un phénotype dû à une surexpression de la protéine X peut être modifié par surexpression de la protéine Y (phénotype de surexpression) [24]. Ces techniques sont devenues désuètes avec l'apparition de méthodes biochimiques.

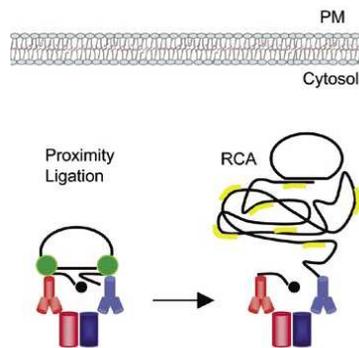
### 2. Méthodes biochimiques.

Les techniques biochimiques sont les plus utilisées parce qu'elles sont les plus nombreuses, les moins chères et les plus accessibles ; généralement elles ne nécessitent pas de matériel complexe. Elles sont toutes basées sur la mise en évidence d'une interaction entre une protéine d'intérêt et une protéine cible. La protéine d'intérêt sélectionne la protéine cible qui va être analysée pour être identifiée. Chacune de ces méthodes a sa spécificité et sa sensibilité. Une haute spécificité signifie que la plupart des interactions détectées existent dans la réalité. Une forte sensibilité signifie que la plupart des interactions existantes vont être détectées. L'utilisation de l'une de ces méthodes dépend donc du type de résultat recherché.

a. Techniques *in vitro*.

La chromatographie d'affinité [26] est une des premières techniques biochimiques utilisées : la protéine d'intérêt est liée à une matrice de sépharose. Les protéines cibles sont retenues puis éluées avec la solution adéquate qui est fonction du système de rétention : salinité, chaotropie, enzymatique. Très efficace, elle nécessite cependant la purification de la protéine d'intérêt. Les techniques utilisant des sondes affines ou protéiques (« affinity probing » et « protein probing ») sont aujourd'hui peu utilisées et ne sont donc pas détaillées ici [24,27,28]. Le transfert de marquage (« label transfer ») [29] et la technique P-LISA [30] sont également très peu utilisées mais elles présentent l'intérêt majeur de pouvoir détecter des interactions faibles et/ou transitoires (cf. figure 3).

**Figure 3** : Système P-LISA.



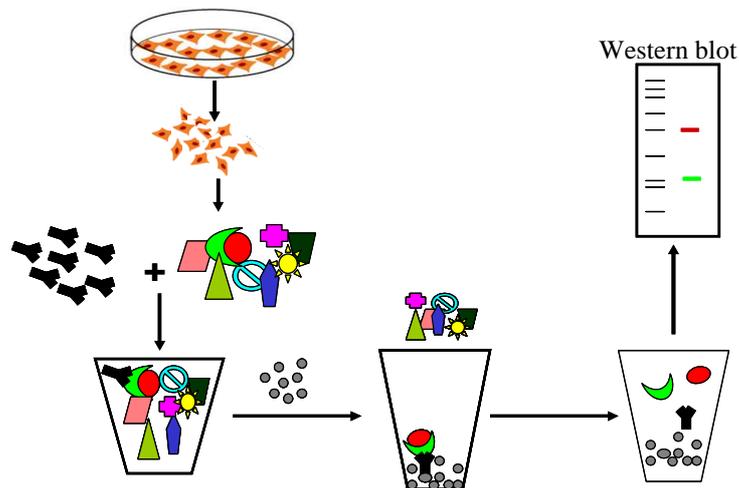
Les protéines sont liées à des anticorps spécifiques covalentement liés à des oligonucléotides spécifiques (« proximity probes »). La proximité des 2 oligonucléotides permet leur connexion, ce qui forme une structure circulaire qui peut être liée par des ADN ligases (points verts). La molécule résultante sert de matrice pour le l'amplification circulaire (RCA). Le produit peut être obtenu par hybridation d'une sonde marquée avec un fluorophore spécifique de la séquence produite (lignes jaunes). Réf. : [25] Suter, B. *et al.* Interactive proteomics: what lies ahead? *BioTechniques* (2008) 44 : 681-91.

Parmi les méthodes biochimiques *in vitro*, deux techniques de mise en évidence de complexe protéique par précipitation sont régulièrement utilisées : la coimmunoprécipitation, basée sur l'utilisation d'un lysat cellulaire [24], et la précipitation du complexe *in vitro* (« pull down »), qui nécessite l'utilisation de protéines recombinantes [31]. Ces techniques présentent l'intérêt majeur de ne pas dénaturer les protéines. Elles ont été utilisées dans ce travail et sont détaillées ci-après.

*i. Coimmunoprécipitation.*

La coimmunoprécipitation est la méthode principale d'étude des interactions protéiques puisqu'il est possible d'utiliser des protéines endogènes, marquées avec une étiquette (« tag ») et/ou surexprimées. A partir d'un lysat cellulaire traité ou non, la protéine d'intérêt est immunoprécipitée avec un anticorps spécifique lié à des billes de protéine A ou G couplées à de la sépharose. Les conditions étant non dénaturantes, toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt vont être aussi précipitées. Après lavages, les complexes protéiques sont dénaturés et les partenaires d'interaction sont analysés sur gel dénaturant (SDS-PAGE) suivie d'une immunoempreinte, ou « western blot », spécifique de la protéine cible supposée (cf. figure 4).

**Figure 4:** Coimmunoprécipitation.



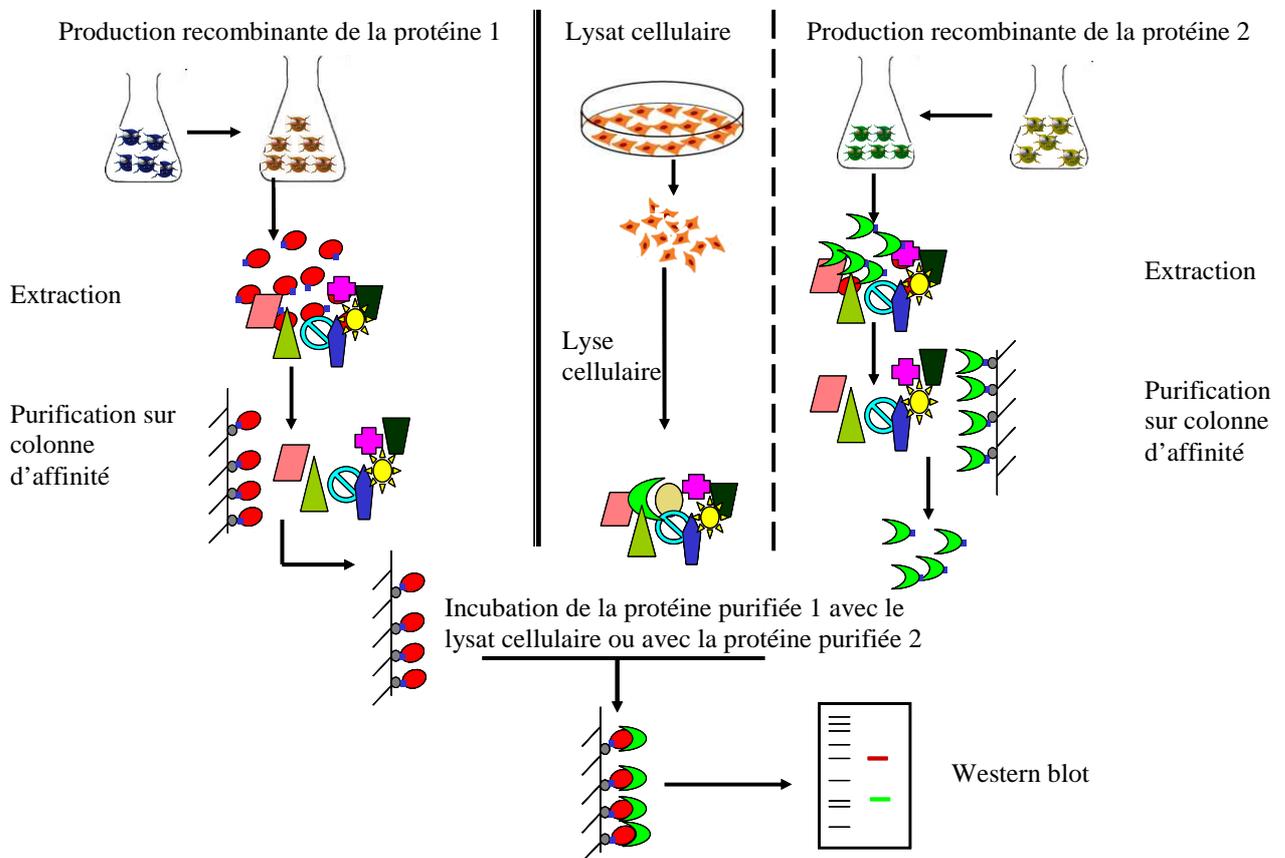
Le complexe protéine 1/protéine 2 (  ) présent dans le lysat cellulaire est hybridé avec l'anticorps anti-protéine 1 (  ) puis précipité par fixation de billes de sépharose (  ) à l'anticorps anti-protéine 1. La présence de la protéine 2 liée à la protéine 1 est analysée par western blot.

Cette méthode permet de détecter à la fois les interactions directes et indirectes. La spécificité de la technique est élevée mais une seule interaction est étudiée par test, il est impossible de cribler une banque de protéines. De plus, il est nécessaire d'avoir au minimum 2 anticorps à disposition. La coimmunoprécipitation est donc généralement utilisée pour confirmer une interaction mise en évidence par d'autres techniques.

ii. Précipitation du complexe *in vitro* : « Pull down ».

Basé sur le même principe de précipitation des complexes protéiques que la coimmunoprécipitation, le « pull down » présente différents avantages et inconvénients [31]. Le principe est schématisé sur la figure 5. La protéine d'intérêt est produite de manière recombinante fusionnée à un « tag » qui va permettre sa purification par affinité sur une matrice correspondante. La protéine cible purifiée ou un lysat protéique est incubé avec la protéine d'intérêt liée à la matrice. Après lavage, les complexes formés sont analysés par western blot afin de vérifier la présence de la protéine cible.

Figure 5 : Principe du « pull down ».



La protéine d'intérêt 1 purifiée et marquée avec un « tag » (●) est mise en contact avec la protéine cible 2 purifiée également marquée (☾) ou avec un lysat cellulaire contenant la protéine 2 (☾). L'interaction se fait *in vitro* et est analysée par western blot.

Légende :

☾☾ Bactéries transformées respectivement avec la séquence de la protéine d'intérêt 1 fusionnée à un peptide de purification (●) et avec la séquence de la protéine d'intérêt 2 fusionnée à un peptide de purification (☾)

☾☾ Bactéries recombinantes produisant les protéines 1 et 2 (respectivement).

Comme pour la coimmunoprécipitation, cette méthode ne permet pas de cribler de nombreuses interactions simultanément et l'identité de la protéine cible est déjà supposée. Dans le cas d'un « pull down » entre deux protéines purifiées, l'interaction démontrée est forcément directe, alors que dans le cas d'un lysat il est possible de détecter également les interactions indirectes. La production recombinante de chacune des deux protéines donne la possibilité de réaliser des mutants de chaque protéine et donc de définir les domaines d'interaction de chacune d'entre elles. Toutefois, le système est réalisé *in vitro* entre deux protéines pures, ce qui peut forcer l'interaction. La concentration de chacune des protéines est donc un paramètre essentiel de la validité de la méthode.

### *iii. Puces à protéines.*

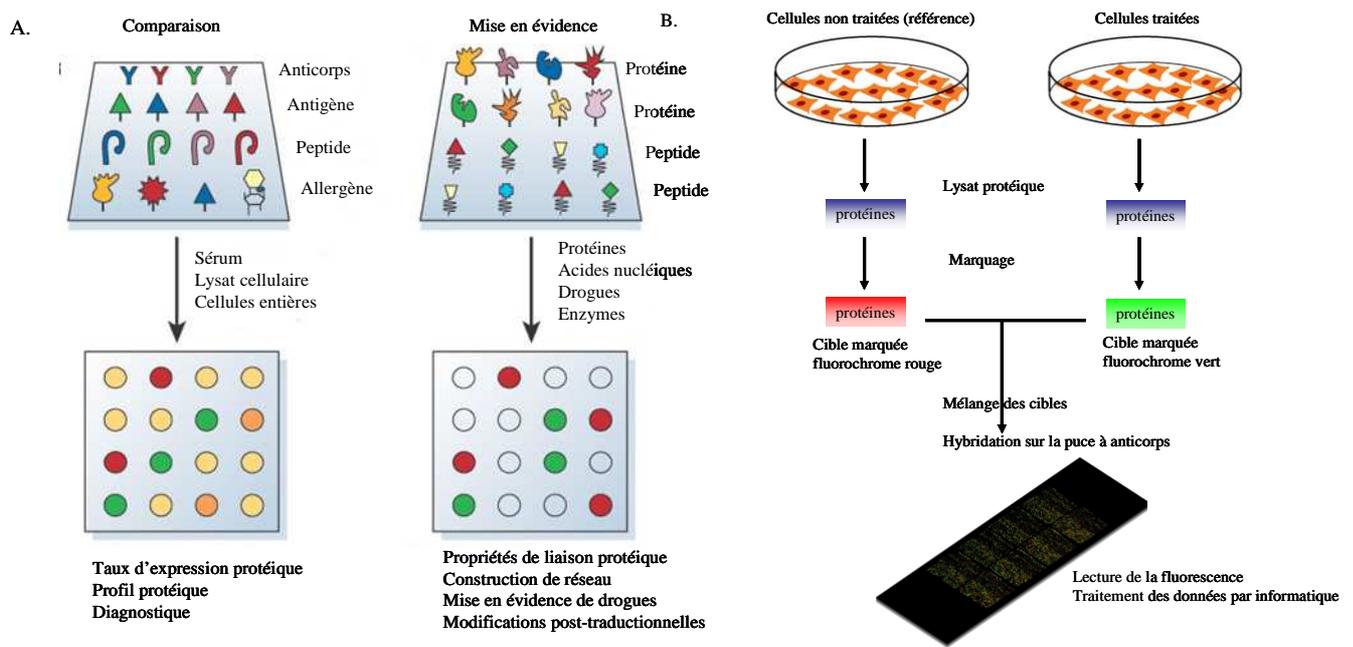
En 1993, la société Affymetrix a mis au point le premier système d'étude des gènes à haut débit, nommé puce à ADN [32]. Les puces à ADN permettent de mesurer et de visualiser très rapidement les différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. Elles sont basées sur la complémentarité entre les deux brins des ADN complémentaires (ADNc) ; la comparaison des profils d'expression génique dans différentes conditions expérimentales permet de fournir des informations pouvant aller de la définition du mécanisme d'action d'une drogue ou de sa toxicité potentielle à la mise en évidence de nouvelles cibles [33]. Cette méthode est rapide, miniaturisée, automatisée, relativement bon marché, l'analyse se fait par des logiciels informatiques et elle permet le criblé simultané de 100 à 30 000 gènes en une seule expérimentation.

Le succès de ce procédé a permis de mettre en place un système similaire où l'ADN est remplacé par des protéines. Les puces à protéines sont destinées à la résolution du réseau d'interactions moléculaires dans les complexes de protéines et dans l'ensemble des organismes, le criblage des inhibiteurs pour l'étude des interactions protéine-protéine, protéine-ADN et protéine-petit ligand, etc. Les puces à protéines sont cependant plus difficiles à mettre en œuvre, les protéines étant des molécules plus fragiles et de composition chimique plus variable que l'ADN. De plus, les protéines ne peuvent être rapidement amplifiées *in vitro* et leur conservation à l'état natif est plus délicate. De ce fait, une des étapes critiques de la mise au point de ces puces est de fixer des protéines à la surface solide de la puce sans les dénaturer et d'avoir une densité assez importante pour pouvoir détecter une activité. Plusieurs méthodes de détection sont possibles (enzymatique, colorimétrique) mais la fluorescence reste la méthode de choix. Les plus connues sont les puces BIACORE et ProteinChip® (CIPHERGEN) pour lesquelles le principe de base est le même, à savoir l'affinité des protéines cibles pour la surface où sont fixées des protéines sondes. Trois types

de puces à protéine sont couramment utilisées : puce analytique, puce fonctionnelle et puce en phase inverse (cf. figure 6A).

Les puces analytiques sont utilisées pour identifier un mélange complexe de protéines afin de mesurer l'affinité de liaison, la spécificité ou le taux d'expression des protéines. Dans ce cas, une banque d'anticorps ou de peptide est fixée sur la surface solide, puis une solution protéique est incubée avec la puce. La puce utilisant des anticorps est la plus usitée [34,35] et est schématisée en exemple sur la figure 6B. Ainsi, les différences de profils d'expression protéique mis en évidence par cette technique peuvent être utilisées pour le diagnostic clinique [36]. Plusieurs travaux ont été effectués sur ce type de puce pour la comparaison de protéome en réponse aux stress environnementaux ou pour la comparaison du protéome de cellules saines avec le protéome de cellules atteintes [37-39].

Figure 6 : Principe des puces à protéines.



A : plusieurs types de puces à protéines existent : divers types de protéines peuvent être attachées à la surface solide de la puce, permettant différentes analyses : comparaison du protéome entre un état d'intérêt et un état de référence ou puce analytique (gauche), ou mise en évidence d'interactions, de réactions ou puce fonctionnelle (droite). B : Exemple d'analyse comparative par puce à protéine où sont fixés des anticorps spécifiques sur la puce.

Ref. : [38] Phizicky E. Protein analysis on a proteomic scale Nature (2003) 422 : 208-15.

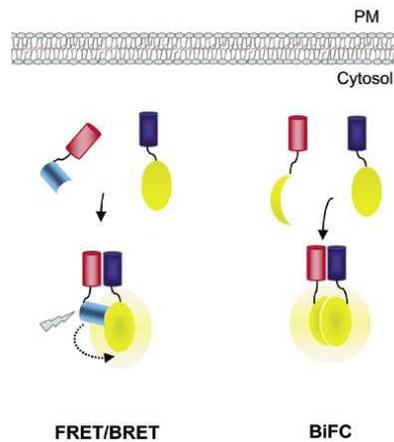
Les puces fonctionnelles sont composées de protéines entières ou de domaines protéiques fonctionnels. Elles permettent l'étude des activités biochimiques d'un protéome entier et sont utilisées pour la détection d'interactions protéine-protéine, protéine-phospholipides et protéine-petit ligand [40,41]. Un 4<sup>e</sup> type de puce existe, la puce en phase inverse (RPA), proche de la puce analytique. Un lysat cellulaire est fixé sur une puce en nitrocellulose, par la suite hybridée avec l'anticorps de la protéine d'intérêt. La quantification du taux de protéine d'intérêt est possible par comparaison avec des peptides de référence analysés en parallèle. La puce RPA permet de déterminer la présence de protéines altérées et notamment lorsque l'altération concerne les modifications post-traductionnelles [42,43].

Malgré la difficulté de mise au point, les puces à protéine peuvent devenir une méthode rapide et à haut-débit pour identifier des changements d'expression ou de fonction de protéines dans une pathologie et donc être utilisées dans les diagnostics. De plus, elles seront une méthode très puissante pour la détection d'interactions protéiques [44-46].

b. Techniques *in vivo*.

Les méthodes *in vivo* nécessitent un matériel particulier puisque l'analyse se fait par lecture de fluorescence ou d'ultra-violet. Les techniques de transfert d'énergie fluorescente ou luminescente par résonance (FRET, BRET) ou de fluorescence par complémentarité bimoléculaire (BiFC) sont schématisées sur la figure 7. Brièvement, les deux protéines, fusionnées à un fluorophore donneur pour l'une et accepteur pour l'autre, sont transfectées dans la cellule. Lorsqu'elles interagissent il y a émission de fluorescence (FRET [47]). Le remplacement du fluorophore donneur par la luciférase induit une émission de bioluminescence et diminue le bruit de fond (BRET [48]). De même, le remplacement des deux fluorophores par deux parties d'un même fluorophore induit une émission de fluorescence uniquement après interaction protéique (BiFC [49]).

**Figure 7** : Détection des interactions par fluorescence et bioluminescence.



*Gauche* : « Fluorescence/Bioluminescence resonance energy transfer » (FRET/BRET). La protéine “appât” (en rouge) est exprimée fusionnée à un fluorophore donneur en bleu clair et la protéine cible est exprimée fusionnée à un fluorophore accepteur en jaune. L’interaction rapproche suffisamment les deux fluorophores induisant un transfert d’énergie par résonance et donc une émission de fluorescence d’une longueur d’onde spécifique. Dans le cas de la méthode BRET, le donneur est substitué par la luciférase. *Droite* : « Bimolecular fluorescence complementation » (BiFC). L’interaction entre les deux protéines reconstituent le fluorophore. La détection se fait par mesure de la longueur d’onde spécifique.

*Réf.* : [25] Suter, B., Kittanakom S., *et al.* Interactive proteomics: what lies ahead? *BioTechniques* (2008) 44 : 681-91.

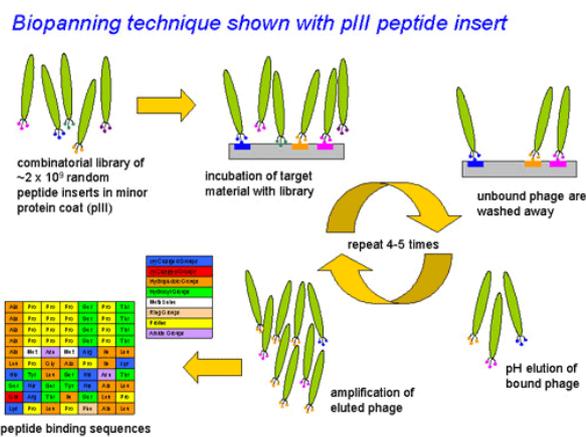
Ces techniques permettent l’étude en temps réel de la dynamique d’association et de dissociation du complexe dans les cellules vivantes. Toutefois leur inconvénient majeur est l’obligation de réaliser des protéines chimères au dépend des protéines endogènes. Ainsi, les résultats obtenus peuvent être faussés par l’expression hétérogène. Pour pallier ce problème et étudier l’interaction dans des conditions plus physiologiques, l’équipe de Suchanek a mis au point en 2005 la technique de pontage *in vivo* (« *in vivo cross-linking* ») [50]. Les cellules prolifèrent avec des analogues diazirine photoréactifs à la leucine et à la méthionine qui s’incorporent aux protéines. Sous exposition aux UV, les diazirines sont activées et se lient aux protéines interagissant entre elles et éloignées de quelques angströms seulement de l’analogue.

Aucune des techniques biochimiques décrites ci-dessus ne permet de mettre en évidence des partenaires d’interaction non soupçonnés, puisqu’il n’est pas possible de cribler

toutes les protéines cellulaires contre la protéine d'intérêt. C'est pourquoi se sont développées les techniques basées sur le crible de banque d'ADN complémentaires (ADNc). Il existe deux méthodes particulièrement usitées pour identifier toutes les interactions cellulaires, le « phage display » et le double hybride.

Le « phage display » a été mis au point en 1990 par Scott *et al.* [51]. Une banque de peptides est fusionnée avec une protéine localisée à la surface du phage. Après exposition de la banque à la protéine cible, l'identification des acides aminés de la banque se fait par séquençage de l'ADN du phage (cf. figure 8). Cette méthode est encore utilisée pour la production de fragments Fc et d'anticorps monoclonaux.

Figure 8 : Phage display.



*Réf.* : [http://hu.cnsi.ucsb.edu/group\\_members/haberer/research/index.php](http://hu.cnsi.ucsb.edu/group_members/haberer/research/index.php)

Le double hybride est la méthode principale d'étude des interactions protéine-protéine employée dans ce travail, elle est donc amplement décrite dans le paragraphe qui suit.

c. Double hybride.

i. Généralités.

Le double hybride est devenu un composant intégral de l'étude des interactions protéine-protéine ; d'ailleurs la majorité des études de ce type en dérivent. La technique de double hybride est un système artificiel de mise en évidence d'interactions protéiques. Il permet de voir des interactions qui ne fonctionnent pas par coimmunoprécipitation. Le double hybride emploie des protéines hybrides, généralement nommées protéine appât et protéine cible. L'interaction des protéines hybrides est détectée par l'apparition d'un phénotype simple à analyser.

Cette technique permet l'identification de complexes protéiques mais aussi d'interaction de protéine avec l'ADN, avec l'ARN ou de petites molécules [52]. Par mutagenèse dirigée, il est possible d'identifier des domaines minimums et des résidus critiques pour l'interaction. Le double hybride et ses techniques dérivées permettent donc facilement l'identification, l'optimisation et la modification des interactions protéine-ADN ou protéine-protéine [53].

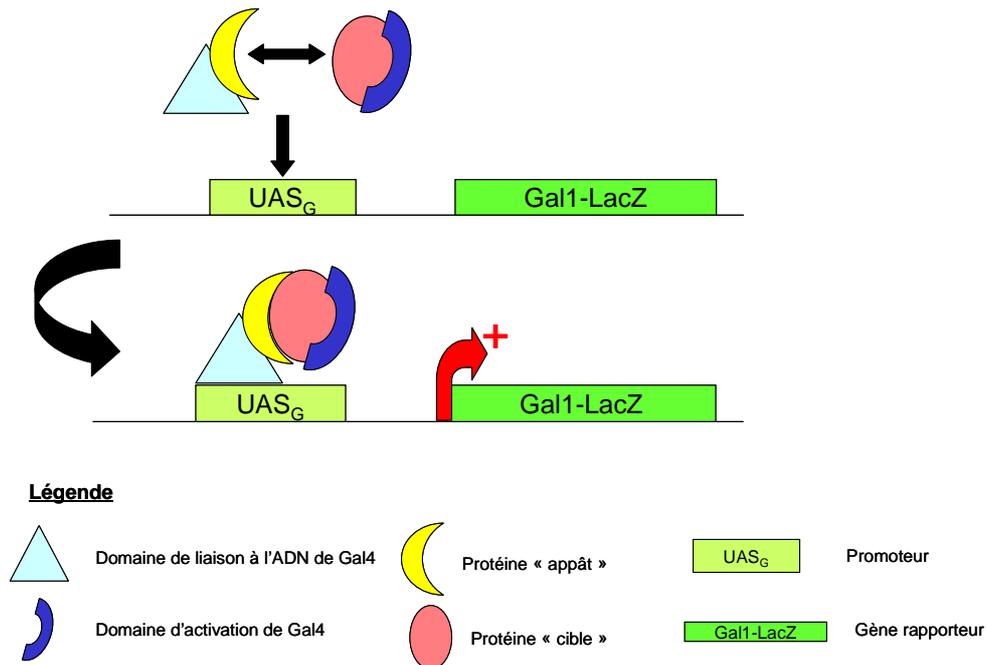
Le double hybride a été mis au point en utilisant l'interaction entre 2 protéines de levure, SNF1 et SNF4 [54]. Cependant la cible peut être constituée d'une banque génique. Dans ce cas, tous les ADN complémentaires ou le génome codant toutes les protéines d'un organisme ou d'un tissu sont criblés afin de répertorier toutes les protéines interagissant avec la protéine d'intérêt à un instant donné.

ii. Double hybride chez la levure.

Le double hybride est une méthode fiable et peu coûteuse de détection des interactions protéiques. Elle est basée sur la modularité des facteurs de transcription eucaryotes et sur l'outil génétique que représente la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Jusqu'alors, les interactions protéine-protéine ne pouvaient s'étudier que par des méthodes biochimiques et/ou *in vitro* ne permettant pas de cribler rapidement de nombreuses interactions simultanément. Le double hybride repose sur l'activation d'un gène rapporteur en réponse à l'interaction de 2 protéines recombinantes.

Dans le cas de *S. cerevisiae* comme hôte, chaque protéine est produite fusionnée à une partie de l'activateur transcriptionnel GAL4. Les deux parties de GAL4 sont réunies grâce à l'interaction des protéines exogènes, les enzymes permettant l'utilisation du glucose vont induire la croissance de la levure sur le milieu sélectif adéquat (cf. figure 9). Ainsi il est possible de cribler un grand nombre d'interactions simultanément sans passer par des étapes de production recombinante et de purification des protéines.

Figure 9 : Principe du double hybride de levure mis au point par Fields and Song.



Le double hybride de levure est le système d'études *in vivo* des interactions le plus répandu dans la littérature ; une recherche dans la base NCBI PubMed indique 10 000 publications en rapport avec cette technique. Parrish en 2006 a publié une revue rassemblant les différentes contributions de la technique dans le réseau d'interactions [55]. La technique a été optimisée et modifiée afin d'accroître la quantité et la qualité des informations obtenues, notamment afin d'établir la carte des sites d'interaction. Les équipes de Kim et de Dhalayan ont mis au point 2 protocoles de définition des sites sensibles de l'interaction. Après identification des 2 protéines, des mutations aléatoires par PCR sujette à erreur (« error-prone PCR ») [56] ou des substitutions « faux-sens » sur les allèles codant la protéine [57] sont créées. Les sites d'interaction sont définis par la perte de l'interaction entre la protéine « appât » mutée et la cible dans un système double hybride. Cette étude se fait plus régulièrement par double hybride inverse [58].

De nombreuses techniques dérivées du double hybride ont été mis au point ces dernières années [25]. Certaines permettent la mise en évidence d'interactions entre protéines au niveau d'un organite (cf. figure 10), comme la membrane [59], le cytosol [60], ou même entre protéines extracellulaires [61]. En effet, le double hybride initial ne permet le recrutement de protéines uniquement au niveau du noyau, excluant les interactions protéines-protéines nécessitant une localisation particulière. Le double hybride par catalyse liée (« tethered catalysis two-hybrid ») met en évidence l'interaction spécifique d'une protéine cible avec une protéine appât ayant subie des modifications post-traductionnelles [62]. L'interaction d'une protéine avec l'ADN se fait par simple hybride, mis au point par Li JJ *et al.* [63], celle avec de petites molécules par triple hybride [64] (cf. figure 10), et l'utilisation de 2 protéines appât a été mise au point par l'équipe de Serebriiskii [65].

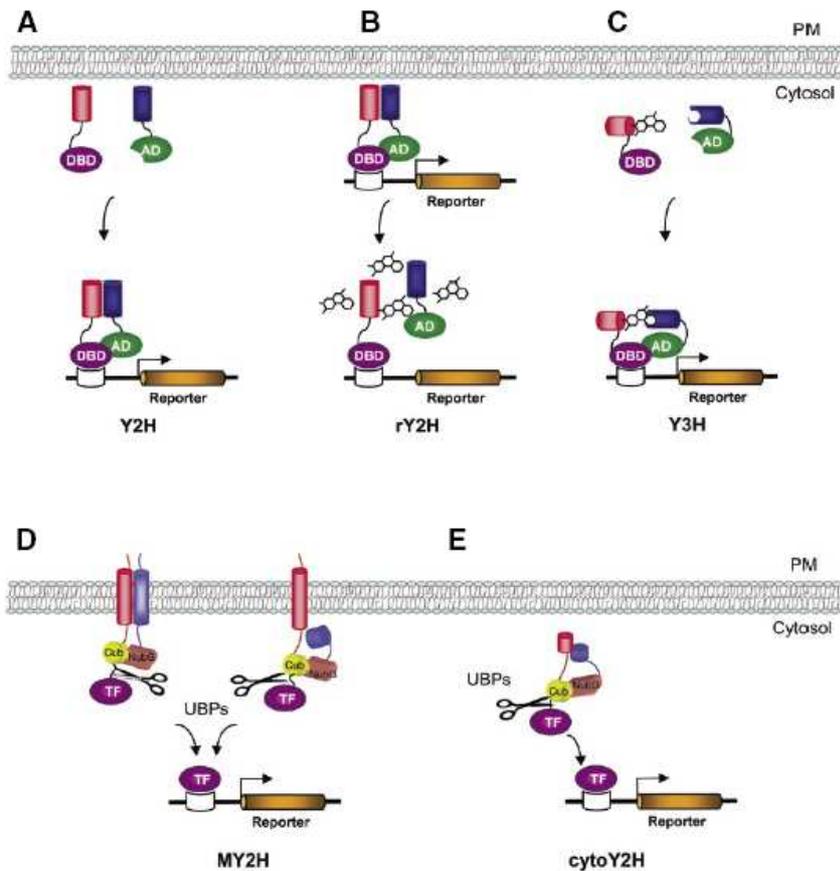
Ce système est un outil dans la découverte d'agents thérapeutiques [66,67], notamment par l'identification de nouveaux facteurs avec des rôles potentiels dans des maladies : les travaux de Rual *et al.* a mis en évidence 300 nouvelles connexions sur 2800, dont plus de 100 protéines associées à des pathologies [68] et ceux de Stelzl ont mis en évidence 2 nouveaux modulateurs de la signalisation de la protéine Wnt [69]. C'est ainsi que les interactions impliquées dans les ataxies d'origine non génétique et le syndrome de Bardet-Biedl ont été définis [70,71]. L'équipe de Kaltenbach a travaillé sur les partenaires d'interactions de la huntingtine, responsable de la chorée de Huntington lorsqu'elle est mutée. A partir d'une étude de double hybride de levure, 104 nouvelles protéines interagissant avec la huntingtine ont été identifiées et 7 d'entre elles pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques car impliquées dans une perte de la toxicité neuronale [72]. Toutefois, dans ce domaine, de meilleurs résultats sont obtenus lorsque le crible est plus spécifique. Les cribles sur des voies spécifiques ou sur des facteurs de maladies donnent des résultats plus exhaustifs, couvrant toutes les facettes du système étudié, contrairement aux cribles globaux. Ceci est dû à la grande modularité des interactions ; l'interactome est un réseau dynamique, en constante modification ; Albers *et al.* a mis en évidence le réseau d'interactions des récepteurs hormonaux nucléaires humains et leurs cofacteurs [73] et Wong *et al.* a défini les protéines impliquées dans la fonction du fuseau mitotique chez *Saccharomyces cerevisiae* [74].

Le double hybride de levure est donc un outil puissant d'étude des interactions protéiques, largement répandu et utilisé depuis 20 ans. Toutefois cette méthode présente aussi de nombreux inconvénients. L'utilisation de l'organisme levure rend le travail laborieux du fait de sa faible vitesse de croissance et de la nécessité de passer par des étapes de sous-clonage en bactérie. Même s'il existe aujourd'hui la possibilité de réaliser cette étude sous

forme de puce et avec l'aide de la robotique, la demande en matériel biologique est élevée. De plus, de nombreux faux-positifs et faux-négatifs existent. La présence de faux-positifs a deux raisons. De nombreuses protéines appât possèdent des similarités avec les protéines de levure, expliquant la forte propension qu'ont les protéines eucaryotes hétérogènes à activer le gène rapporteur sans réelle interaction (« self-activation »). Il est aussi possible d'induire de fausses interactions par forçage du système du à la surexpression des protéines. La présence de faux-négatifs est due d'une part à l'impossibilité de détecter des interactions entre protéines dont la localisation n'est pas nucléaire et d'autre part à une structure tertiaire erronée des protéines (modifications post-traductionnelles modifiées ou absentes, repliement incorrect).

Pour pallier ces différents problèmes, d'autres systèmes de double hybride ont vu le jour ces dernières années.

Figure 10 : Applications de la technique du double hybride.



A. Double hybride classique. DBD : domaine de liaison à l'ADN. AD : domaine d'activation.

B. Double hybride inverse. Le gène reporteur produit un métabolite toxique qui dissocie le complexe et entraîne la mort.

C. Triple hybride. Une petite molécule se lie aux deux protéines.

D. Double hybride membranaire. Fusion à un domaine d'une ubiquitine. L'interaction induit le clivage ubiquitine-facteur de transcription qui active le gène rapporteur.

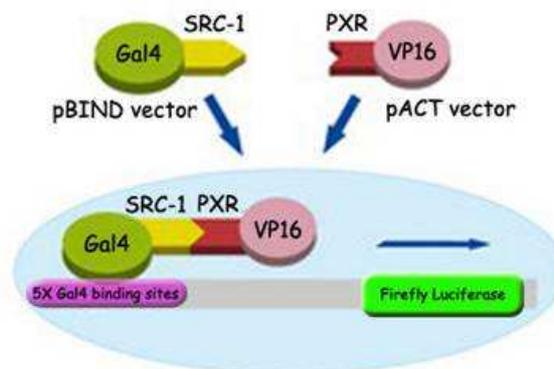
E. Double hybride cytosolique. Principe identique au membranaire.

*Réf.* : [25] Suter, B., Kittanakom S., *et al.* Interactive proteomics: what lies ahead? *BioTechniques* (2008) 44 : 681-91.

iii. Double hybride chez les mammifères.

L'utilisation d'un double hybride en cellule de mammifère mis au point Luo *et al.* semble être pour l'étude des interactions protéine-protéine chez l'Homme le système le plus fiable et le plus proche d'un contexte spécifique [75]. Comme dans le cas de la levure, ce double hybride est basé sur la reconstitution de la fonction d'un activateur transcriptionnel : l'une des protéines est produite fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et l'autre au domaine d'activation de la protéine VP16 du virus de l'herpès (cf. figure 11). Les deux vecteurs sont cotransfectés avec le vecteur portant le gène rapporteur (chloramphenicol acetyltransferase) dans une cellule de mammifère.

Figure 11 : Principe du double hybride de mammifère.



Réf. : [76] Lim, YP.

Huang, J. Pregnane X

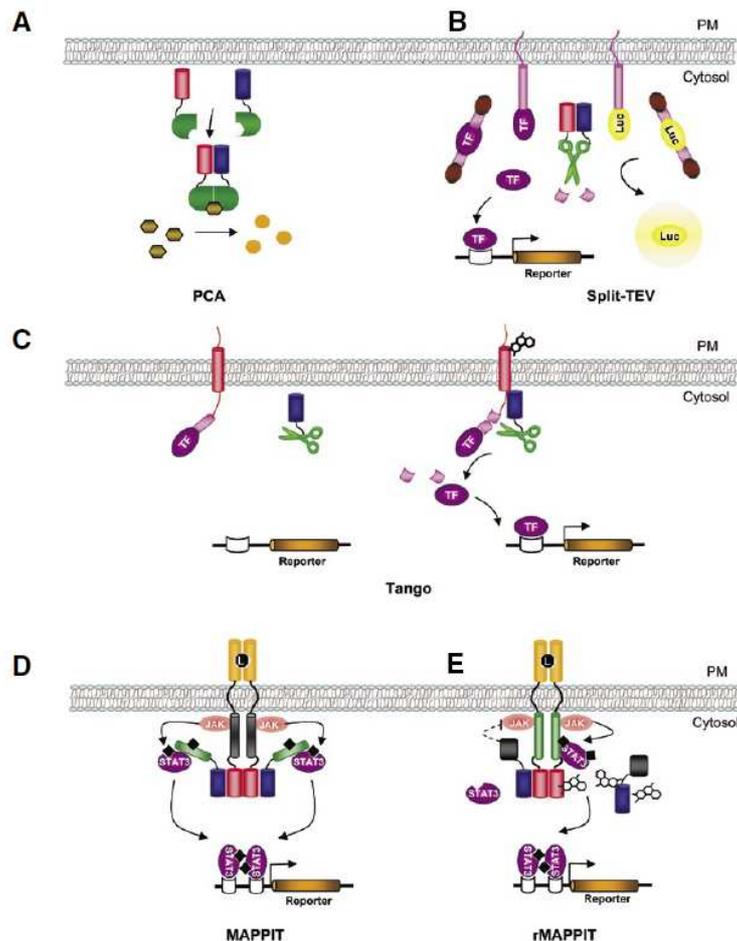
receptor polymorphism affects CYP3A4 induction via a ligand-dependent interaction with steroid receptor coactivator-1. Pharmacogenetics and Genomics (2007) 17 : 369-82.

La méthode a été validée avec l'interaction des protéines p53 et l'antigène T du virus SV40 qui avait précédemment été montré par un double hybride de levure. Deux systèmes variants ont été mis au point : le split-TEV, basé sur la complémentation d'une protéase du virus et du tabac après interaction [77], et le MAPPIT, basé sur la restauration d'un mécanisme de signalisation ligand-récepteur [78], utilisé lorsque l'interaction se produit dans le contexte de l'activation d'un récepteur. La figure 12 présente les différents types de double hybride en cellule de mammifère [25].

Cependant, ces techniques restent onéreuses pour le moment, difficilement réalisables en haut débit et la probabilité de faux-positifs due à l'activation automatique du gène rapporteur risque d'être très élevée. Elles sont donc généralement utilisées pour confirmer une

interaction mise en évidence par d'autres techniques. En effet, il n'y a que dans les cellules de mammifères que le repliement des protéines de mammifères est correct et que les modifications post-traductionnelles sont exactes.

**Figure 12** : Systèmes de complémentation et de reconstitution dans les cellules de mammifères.



A. Complémentation de protéine. L'interaction induit la restauration de l'activité enzymatique.

B. Split-TEV. La protéase virale activée par l'interaction active la luciférase et le facteur de transcription.

C. Tango. Activation du facteur de transcription par recrutement d'une molécule signalé auprès d'un récepteur activé.

D. MAPPIT. L'interaction restaure la signalisation de la voie impliquant les kinases JAK et le facteur de transcription STAT3.

E. MAPPIT inverse. L'interaction supprime la voie de signalisation via un récepteur leptine chimérique. La dissociation de l'interaction par un inhibiteur restaure la voie de signalisation.

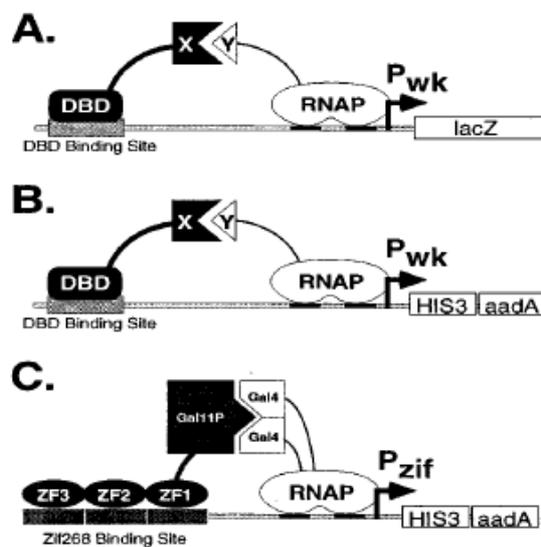
*Réf.* : [25] Suter, B., Kittanakom S., *et al.* Interactive proteomics: what lies ahead? *BioTechniques* (2008) 44 : 681-91.

i. Double hybride chez les procaryotes.

- Principe et utilisation dans la bibliographie.

C'est suite à la découverte de la possibilité d'une interaction arbitraire entre une protéine liée à l'ADN telle que  $\omega$  et l'ARN polymérase bactérienne activant la transcription [79,80] puis à la mise en évidence de l'importance du promoteur qui est fixé aux deux partenaires d'interaction [81] que l'équipe de Joung a transféré la technique de double hybride de la levure à la bactérie *E. coli* [53,82] schématisée sur la figure 13.

Figure 13 : Principe du double hybride bactérien développé par Joung.



A. Activation transcriptionnelle décrite par Hochschild [81].

B. Gène rapporteur modifié pour le double hybride.

C. Exemple de l'interaction Gal4 et Gal<sup>11P</sup>. ZF1, 2, et 3 sont des domaines en doigt de zinc de la protéine Zif268.

Réf. : [53] Joung, J. K., Ramm E. I., *et al.* A bacterial two-hybrid selection system for studying protein–DNA and protein–protein interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2000). 97 : 7382-87.

La protéine liée à l'ADN interagissant avec l'ARN polymérase d'*E. coli* est la protéine lambda cI ( $\lambda$ cI). La protéine  $\lambda$ cI est un répresseur transcriptionnel qui contrôle le cycle lytique du bactériophage  $\lambda$ . Lorsqu'il est lié à l'opéron  $\lambda$ ,  $\lambda$ cI empêche l'expression des gènes impliqués dans le programme lytique et permet l'intégration de l'ADN de  $\lambda$  dans le chromosome d'*E. coli*. La protéine  $\lambda$ cI est un dimère de 2 chaînes polypeptidiques identiques de 236 acides aminés. Chaque chaîne contient un domaine N-terminal qui se lie à l'ADN et un

domaine C-terminal qui est responsable de l'homodimérisation. Le monomère ou le domaine de liaison à l'ADN seul ne peut réprimer la transcription des gènes lytiques. Par contre, lorsque le domaine de liaison à l'ADN est fusionné à un polypeptide ou à une protéine qui peut dimériser, la dimérisation peut alors être rétablie et de ce fait le répresseur chimérique est restauré.

Chez *E. coli*, le recrutement de l'ARN polymérase à des promoteurs spécifiques par des contacts entre protéines peut considérablement augmenter le taux de transcription des gènes correspondants [80,83]. L'activation de la transcription de nombreux gènes chez *E. coli* implique des interactions spécifiques entre un activateur lié à l'ADN et le domaine C-terminal de la sous-unité alpha de l'ARN polymérase. Dove *et al.* a montré que ces contacts peuvent être remplacés par des interactions protéine-protéine artificielles [80]. Ils ont mis au point une construction chimérique de la sous-unité alpha dans laquelle le domaine C-terminal a été remplacé par le domaine de dimérisation de  $\lambda$ cI. La sous-unité chimérique interagit spécifiquement avec  $\lambda$ cI, ce qui stimule la transcription du gène *LacZ* sous le contrôle d'un promoteur *lac* artificiel ayant en amont l'opéron  $\lambda$  [81]. En utilisant différents mutants de  $\lambda$ cI, l'équipe de Dove a montré que l'amplitude de l'activation de la transcription est corrélée avec la force de l'interaction entre les protéines chimériques. Ils en ont ainsi conclu qu'il était possible de mettre en évidence des interactions protéiques *via* cette activation transcriptionnelle et l'ont montré en utilisant l'interaction entre deux protéines de levure, Gal4 et Gal<sup>11P</sup> [80,84].

Le double hybride bactérien chez *E. coli* repose donc également sur l'activation d'un gène rapporteur suite à l'interaction de deux protéines recombinantes. Il a été validé par l'interaction entre les protéines « leucine zipper » fos et jun [85] et par les travaux de l'équipe de Di Lallo qui a testé le double hybride bactérien basé sur la répression du gène rapporteur sur différentes protéines de 100 à 800 acides aminés (aa) [86].

Parallèlement, d'autres systèmes de mise en évidence d'interaction protéiques chez la bactérie existent, rassemblés par Ladant dans « Research in Microbiology » [87]. Clarke *et al.* a travaillé sur un système utilisant la conjugaison plutôt que la transformation, ce qui simplifie la technique pour le crible et la rend apte à une automatisation analogue à celle développée pour le double hybride chez la levure [88]. Le second système est basé sur la reconstitution d'une voie de signalisation basée sur le contrôle positif qu'exerce l'AMPc et non sur une activité transcriptionnelle [89]. L'interaction induit la reconstitution du domaine catalytique de l'adénylate cyclase chez *Bordetella pertussis*, induit la production d'AMPc et donc l'activation des opérons lactose ou maltose, donnant un phénotype caractéristique.

De nombreuses publications montrent l'existence de complexes protéiques et leur activité suite à un criblage par double hybride bactérien : étude des partenaires de 12 péroxines de mammifères [90], protéines impliquées dans le cytosquelette et la régulation de la barrière endothéliale après mise en évidence de leurs interactions [91], nouveau rôle d'une enzyme connue de réparation de l'ADN due à sa son interaction avec une protéine cytosolique [92] ou régulation du métabolisme secondaire chez *Pseudomonas fluorescens* [93].

- Avantages et inconvénients.

Les avantages d'un système double hybride bactérien sont nombreux. Les bactéries croissent plus rapidement que la levure et ont un plus fort rendement de transformation, permettant un criblage plus important, plus rapide et simultané des interactions sans étape d'extra-transformation. De plus, le travail en bactérie permet de diminuer de façon drastique la probabilité de faux positifs dus à l'existence de protéines homologues entre la levure et l'organisme d'intérêt. Lorsque l'étude porte sur la signalisation intracellulaire et les protéines régulatrices du cycle cellulaire humain, la production de telles protéines eucaryotes chez la levure risque d'induire une toxicité létale pour celle-ci, alors que le risque est quasiment inexistant chez la bactérie, le système de prolifération des procaryotes étant différent.

Toutefois cette méthode présente des inconvénients, tels que la production des protéines exogènes dans les corps d'inclusion ou la difficulté pour la bactérie de produire une protéine exogène correctement à cause de la différence de fréquence d'utilisation des codons. Au-delà de ces inconvénients qui sont dépendants des protéines d'intérêts, l'inconvénient majeur est du à l'incapacité de la bactérie à réaliser les modifications post-traductionnelles nécessaires dans certains cas aux interactions, comme les glycosylations. Ceci peut amener à l'identification de complexes inexistant dans l'organisme d'origine, ou inversement empêcher l'identification de partenaires. Cependant, la levure réalise des glycosylations mais les chaînes carbonées ajoutées sont différentes, ce qui peut induire les mêmes inconvénients que ci-dessus.

Nous avons donc choisi d'utiliser un système de double hybride bactérien pour sa rapidité et son efficacité. Le système utilisé, « Bacteriomatch II two-hybrid », commercialisé par Stratagene Inc. est décrit en détail dans le premier chapitre.

### 3. Méthodes biophysiques et théoriques.

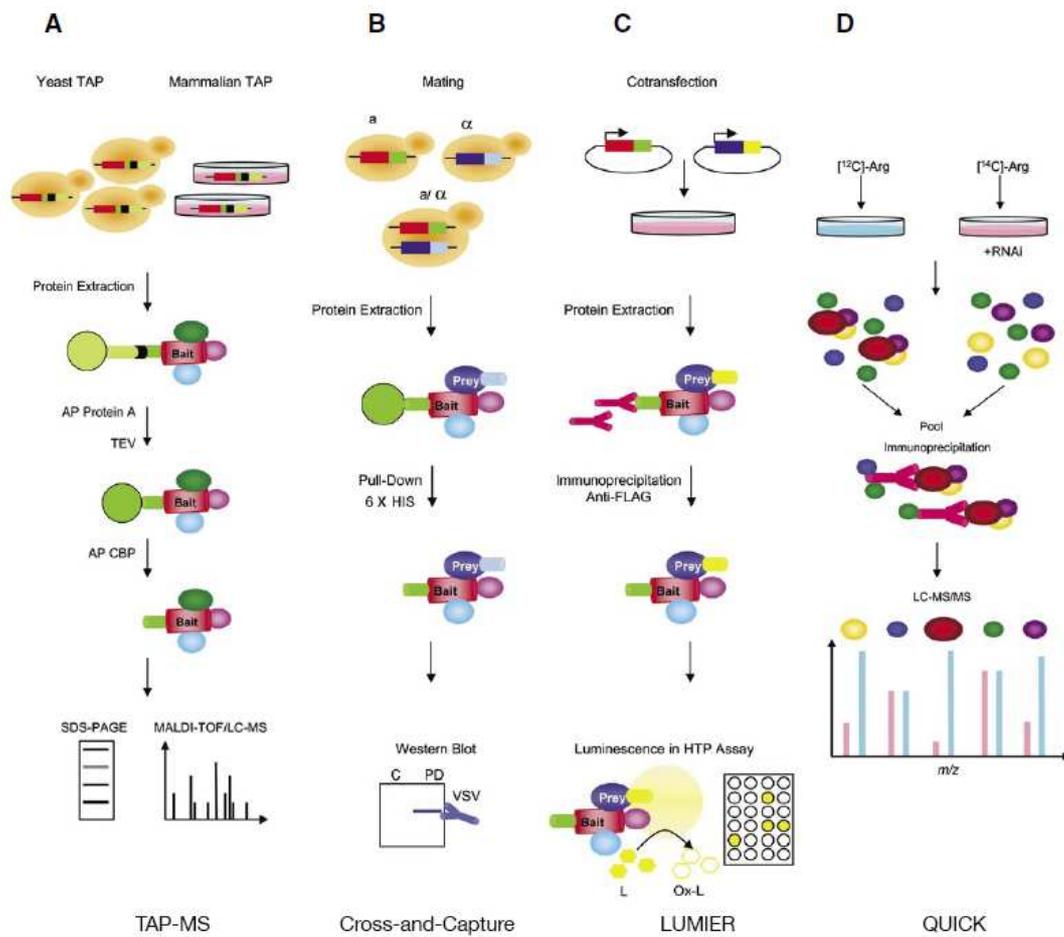
Depuis 10 ans, les progrès des technologies basées sur des propriétés physiques et notamment l'application de la spectrométrie de masse à la biologie a permis à de nouvelles techniques de voir le jour pour étudier les interactions protéine-protéine. Elles permettent d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure des complexes mais aussi de réaliser des cribles des protéomes cellulaires. Toutefois, ces techniques restent encore difficilement applicables pour tous les laboratoires, le matériel nécessaire étant coûteux et nécessitant des formations particulières.

La figure 14 schématise le principe de quatre nouvelles méthodes *in vitro* : la purification par affinité en tandem [94], les techniques « cross & capture » [95], QUICK [96] et LUMIER, qui permet l'automatisation des procédés [97].

Trois autres techniques physiques sont applicables à l'étude des interactions. L'adsorption à une surface (« surface plasmon resonance » [98]) et la détermination de la taille et de la distribution de molécules dans une solution (« static/dynamic light scattering » [99]) permettent de mesurer en temps réel l'interaction entre deux protéines. La méthode « dual polarisation interferometry » [100] permet de voir les changements de conformation des protéines.

La bioinformatique apporte elle aussi sa contribution à l'étude des interactions protéine-protéine par des méthodes et des logiciels comme « molecular dynamics » [101] et « protein-protein docking » [102].

Figure 14 : Détection des interactions protéine-protéine par méthodes biophysiques.



*Réf.* : [25] Suter, B., Kittanakom S., *et al.* Interactive proteomics: what lies ahead? BioTechniques (2008) 44 : 681-91.

### III. Applications en recherche clinique et industrielle.

L'étude des interactions protéine-protéine est donc devenue un projet majeur de la recherche, dont l'application la plus immédiate serait l'utilisation en routine des techniques pour le diagnostic et le pronostic des maladies infectieuses, auto-immunes et allergiques. En conséquence, et bien que les protéines ne soient pas des molécules facilement manipulables, des sociétés biotechnologiques investissent dans la mise en œuvre de nouvelles technologies pour l'étude de ces interactions.

Les entreprises s'axent actuellement sur la mise au point et la vente de systèmes permettant le criblage de nombreuses données très rapidement, c'est-à-dire les méthodes de double-hybride et surtout de puce à protéines. Les besoins croissants de la recherche en analyse protéomique représentent un marché conséquent pour ces sociétés. Par exemple, les sociétés ProtNeteomix et Hybrigenics se positionnent comme des fournisseurs de services associés pour identifier, valider et inhiber les interactions entre protéines. Parallèlement, Hybrigenics est également impliquée dans des projets de recherche communs avec l'institut Curie. La fondation caritative indépendante britannique Wellcome Trust Sanger Institute a développé une nouvelle méthode à grande échelle (AVEXIS), sous brevet, permettant d'identifier efficacement les interactions à l'endroit où débute la communication ainsi que les interactions fugaces et faibles [103]. Dans le cadre d'une initiative de l'union européenne baptisée LIFE QUALITY visant à concevoir de nouvelles thérapies contre le cancer, les travaux se sont traduits par un procédé breveté capable d'identifier les interactions protéine-protéine réversibles utilisable pour n'importe quelle interaction protéine-protéine basée sur une affinité moyenne ou forte. Enfin, en 2002 la société Qiagen a mis au point la première puce à protéine en phase liquide : le système « LiquiChip Protein Suspension Array » (références cf. annexe 1)

Les projets les plus avancés concernent le domaine sanitaire, tant au niveau diagnostique que thérapeutique. Toutefois, l'industrie agro-alimentaire s'intéresse également à l'application des interactions protéine-protéine dans la production industrielle. Notamment, l'industrie se heurte à des problèmes d'agrégation ou de perte de fonction des protéines lors de leur production. En effet, quelque soit le produit alimentaire, les protéines sont responsables des qualités du produit fini.

La majorité des travaux sur ce sujet portent sur le lait et ses dérivés. Par exemple, la fabrication de poudre de lait implique différents traitements induisant des interactions entre les différentes protéines du lait ce qui modifie les propriétés du produit fini. Le préchauffage

nécessaire provoque une dénaturation des protéines et leur association avec les micelles de caséine, et ces changements ont un impact sur les propriétés fonctionnelles du produit [104,105].

Outre les études sur le lait et ses dérivés, peu d'études ont montré l'importance des interactions pour les fonctionnalités des protéines dans l'industrie. La carraghénane est un polysaccharide extrait d'algues rouges servant d'agent d'épaississement et de stabilisation dans l'industrie alimentaire. Il s'avère que l'interaction entre la carraghéane et la  $\beta$ -lactoglobuline et des protéines de soja augmentent les propriétés du gel formant le produit fini [106]. Les carotènes sont largement utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour leurs propriétés colorantes, et également dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité de photoprotection. L'émulsion des caroténoïdes est laborieuse de par la difficulté de transférer les caroténoïdes en phase lipidique. Habituellement, des solvants organiques sont utilisés pour les dissoudre. Wackerbarth *et al.* a utilisé les interactions protéiniques pour préparer une émulsion : les caroténoïdes se solubilisent s'ils sont dans un premier temps liés avec l'albumine du sérum bovin (BSA) [107].

Aujourd'hui, seuls quelques projets sur les interactions protéine-protéine permettent une application concrète directe. Ceci est largement dû aux difficultés de manipulation de la matière première, les protéines, mais aussi au manque d'automatisation des systèmes d'étude. Pourtant, les progrès dans ce domaine s'accroissent rapidement, laissant entrevoir une place primordiale des interactions protéine-protéine dans les domaines sanitaires et agro-alimentaires.

#### IV. Contexte scientifique et objectifs de la thèse.

L'équipe « mobilisation des réserves » de l'unité de recherche « Physiologie moléculaire des semences » s'intéresse à la caractérisation des facteurs de contrôle de la germination. Les résultats des travaux sur la germination [108] ont mis en évidence un nouveau gène réprimé au cours de la germination, *MtSAP1*, pour *Medicago truncatula* Stress-Associated Protein 1. MtSAP1 appartient à la famille des protéines de stress SAP, dont il existe des orthologues chez tous les organismes. Chez l'Homme il existe une homologie au niveau des domaines fonctionnels, dont 2 sont particulièrement proches de MtSAP1, les protéines en doigt de zinc avec un domaine de type AN1 5 et 6 (N° accès NCBI NP\_005998 et NP\_061879). Un de ces orthologues intervient dans la voie de signalisation des facteurs NF-kB et TNF et aurait donc un rôle dans la régulation de l'apoptose [109]. Malgré ces informations, l'implication de ce gène dans la biologie des semences reste inconnue.

Parallèlement, l'une des thématiques de l'équipe « Thérapies ciblées dans le traitement du cancer colorectal » de l'unité INSERM U892 d'Angers est l'étude de protéines régulatrices de la prolifération cellulaire tumorale, dont l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 et le facteur de transcription STAT3. De nombreuses études ont été réalisées sur ces deux protéines et leurs différentes fonctions sont bien connues [110,111]. Cependant, leur activité et leur degré d'implication dans divers mécanismes comme l'apoptose ou la réponse inflammatoire restent incertains.

Ces deux équipes de l'université d'Angers ont souhaité collaborer afin de croiser des informations sur la protéine de stress MtSAP1 et les régulateurs de prolifération p21 et STAT3 afin d'appréhender les fonctions de MtSAP1 chez *Medicago truncatula* et chez l'Homme et son possible lien fonctionnel avec les protéines STAT3 et p21. Le travail que constitue ce manuscrit avait pour but de définir les implications de ces protéines dans les processus de réponse aux stress *via* l'étude de leurs interactions protéine-protéine. Cet objectif a abouti à la caractérisation de MtSAP1 et à la détection d'interactions impliquant chacune de ces protéines *via* l'utilisation du double hybride bactérien. Le premier chapitre décrit le double hybride bactérien utilisé pour la mise en évidence des partenaires d'interaction de MtSAP1, STAT3 et p21. Dans un second chapitre nous verrons la caractérisation de la protéine MtSAP1 au cours de la germination ainsi que ses partenaires d'interaction potentiels. La dernier chapitre traite des résultats obtenus pour le double hybride des protéines STAT3 et p21 ; de plus l'activité d'un nouveau complexe impliquant p21 sera discutée.

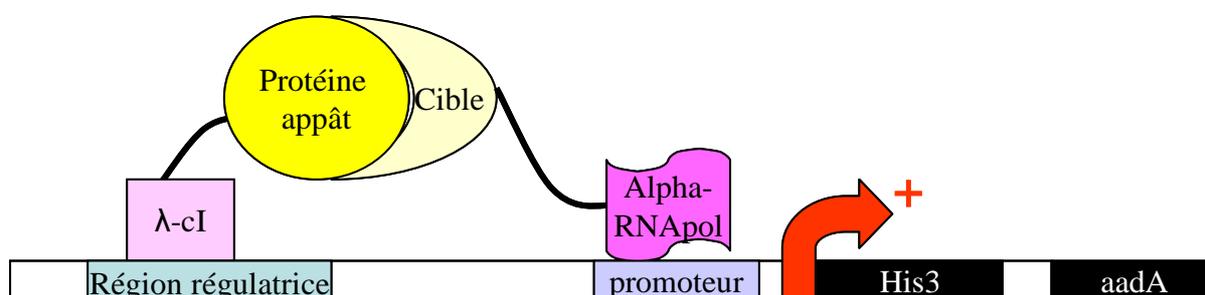
**CHAPITRE 1 :**  
**LE DOUBLE HYBRIDE BACTERIEN**

## Principe.

Le double hybride repose sur le principe d'activation d'un gène rapporteur suite à l'interaction de 2 protéines recombinantes, mis au point par Joung en 2000 et 2001 [53,82].

Le système que nous avons utilisé est le système « Bacteriomatch II two-hybrid » (Stratagene Inc). La protéine d'intérêt ou protéine appât est produite fusionnée au répresseur bactériophage  $\lambda$  ( $\lambda$ cI) alors que la protéine cible est produite fusionnée à la sous unité alpha de l'ARN polymérase ( $\alpha$ RNApol). La production recombinante des deux protéines de fusion par addition d'IPTG induit le rapprochement de  $\lambda$ cI avec  $\alpha$ RNApol sur les promoteurs, activant ainsi la transcription des gènes rapporteurs *HIS3* et *aadA* (cf. figure 15). Dans le cas d'un criblage des protéines cellulaires interagissant avec la protéine appât, la protéine cible correspond à toutes les protéines cellulaires, les cibles. Les séquences cibles, que nous avons choisi d'utiliser dans ces travaux, sont donc des séquences d'ADN complémentaires (ADNc) issus d'une banque.

Figure 15 : Principe du double hybride bactérien.



Le gène *HIS3* code l'enzyme HIS3 qui permet la croissance de la bactérie sur un milieu dépourvu d'histidine. Dans les bactéries utilisées, l'enzyme HIS3 est produite en très faible quantité en absence d'activation de la transcription, c'est pourquoi le milieu sélectif contient un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3, le 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). Le gène *aadA* code une protéine conférant une résistance à la streptomycine.

L'interaction entre les deux protéines exogènes induit donc une croissance des bactéries sur milieu minimum dépourvu d'histidine contenant du 3-AT et de la streptomycine.

## Matériels et Méthodes

Le protocole utilisé dans ce travail respecte les instructions de Stratagene, disponibles sur le site du fournisseur (<http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf>). Afin de faciliter la lecture de ces travaux, les différentes étapes décrites ici sont simplifiées.

Afin de produire les protéines chimériques, les séquences codantes doivent être insérées correctement dans les vecteurs de transformation adéquats. La séquence d'ADNc codant la protéine appât est insérée par deux sites de restrictions en phase directement en aval de la séquence de  $\lambda$ cI dans le plasmide pBT portant la résistance au chloramphénicol comme marqueur de sélection. La séquence d'ADNc codant la protéine cible (ici la banque d'ADNc) est clonée *via* deux sites de restrictions en aval de la séquence de l' $\alpha$ RNApol dans le plasmide pTRG portant la résistance à la tétracycline comme marqueur de sélection.

### I. Constructions du plasmide recombinant pBT.

La séquence d'intérêt est amplifiée par PCR. Les sites de restriction nécessaires au clonage dans pBT sont insérés *via* les parties flanquantes des amorces utilisées lors de la PCR. Le mélange réactionnel de la PCR est le suivant : matrice, dNTPs (concentration finale 0,4 $\mu$ M), amorces sens et antisens (concentration finale 0,4 $\mu$ M chacune) et 0,05 U/ $\mu$ l d'enzyme Taq DNA polymérase.

Le produit PCR obtenu et le plasmide pBT (2 $\mu$ g de chaque) sont digérés par le couple d'enzymes de restriction adéquats pendant 2h à 37°C, purifiés et dosés par spectrométrie.

L'insertion du produit PCR dans le plasmide pBT est réalisée selon le protocole de Stratagene. Pour un ratio ADN : vecteur de 1 pour 1, la formule est la suivante :

$$(y \text{ ng d'ADN}) = \frac{((\text{nombre de paires de base de l'ADN}) \times (100\text{ng de vecteur}))}{(\text{nombre de paires de base du vecteur})}$$

Dans ce cas, un ratio ADN : vecteur de 3 pour 1 a été utilisé. Le mélange réactionnel de la ligation de l'insert dans pBT est le suivant : x ng insert, 100ng de pBT, 1mM de rATP et 2 unités de T4DNA ligase. La ligation s'opère pendant une nuit à 12°C.

Le produit de ligation est transformé dans la souche bactérienne XL1blue MRF' Kan. Le produit ADN-vecteur (10 $\mu$ l) est incubé avec les bactéries thermocompétentes (100 $\mu$ l), puis le choc thermique est réalisé pendant 35sec à 42°C. Les bactéries transformées sont par la suite déposées sur milieu LB-agar-chloramphénicol 25 $\mu$ g/ml et incubées à 30°C sur la nuit.

Les clones présentant un plasmide recombinant sont sélectionnés et après extraction de l'ADN plasmidique de chaque clone, les séquences et leur insertion dans le plasmide sont vérifiées par séquençage, réalisé par l'entreprise MilleGen S.A. (Labège, France), avec l'amorce pBT\_F (5'-TCCGTTGTGGGGAAAGTTATC-3').

## II. Construction de la banque ADNc.

### 1. Obtention des ADNc.

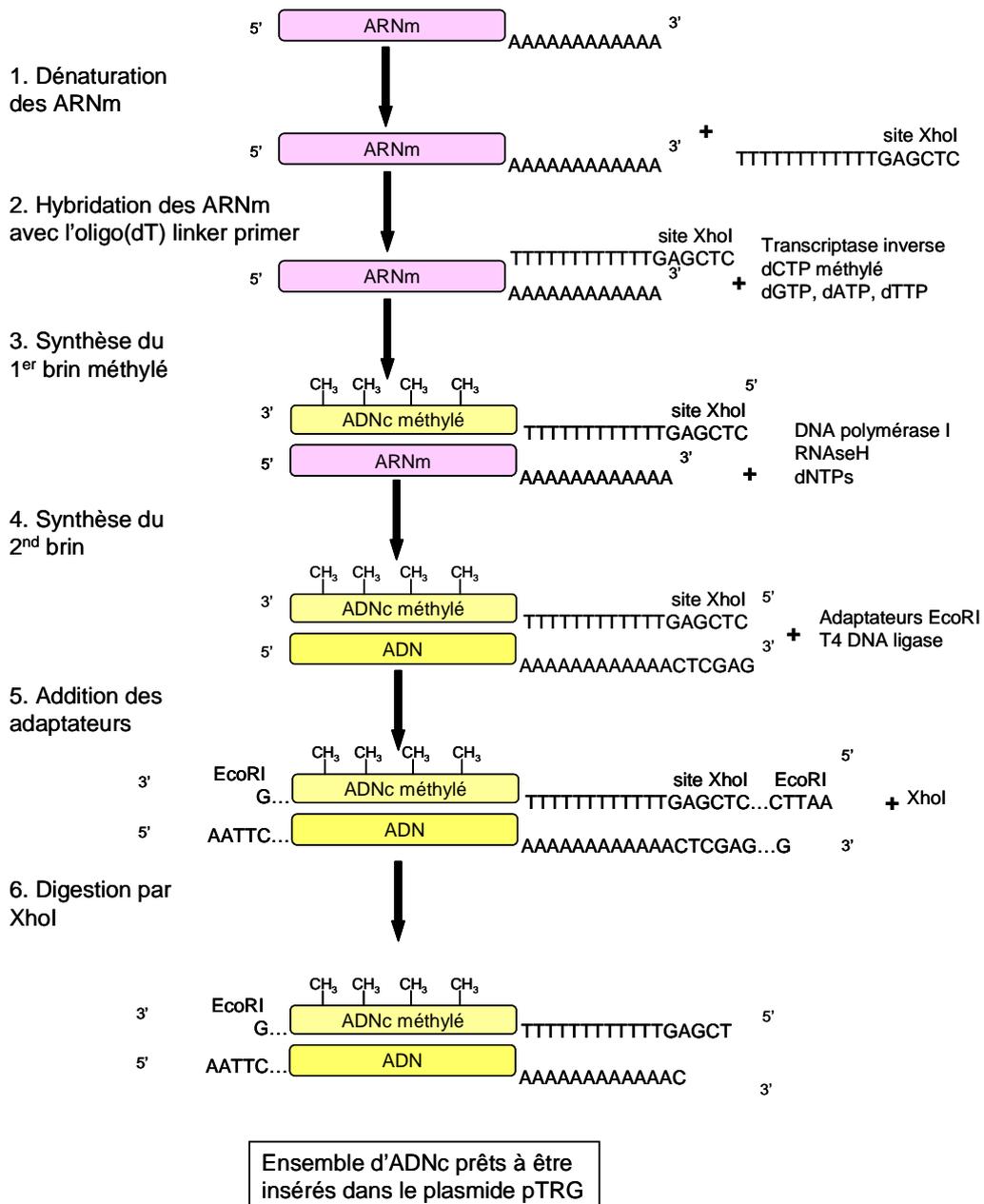
La synthèse des ADNc est schématisée sur la figure 16 ci-contre.

Les tissus ou les cellules de l'organisme étudié sont lysées pendant 5min à température ambiante avec du TriReagent (Ambion) ; les ARN totaux sont séparés avec du chloroforme pendant 5min, centrifugés à 14000rpm pendant 10min à 4°C, puis précipités avec de l'isopropanol. Le culot est repris dans de l'eau dEPC puis les ARN messagers sont purifiés à partir des ARN totaux. Les ARNm purs (5µg) sont dénaturés pendant 2min à 70°C. La synthèse du premier brin se fait par addition des ARNm au mélange réactionnel et incubation pendant 10min à température ambiante pour permettre l'hybridation de l'amorce sur les ARNm. L'ajout de la transcriptase inverse StrataScript (75U) et de 5-methyl-dCTP (300µM) induit la synthèse du premier brin méthylé. Un aliquot de 5µl est alors prélevé comme contrôle et marqué au <sup>32</sup>P. Le contrôle et le reste du mélange réactionnel sont incubés 1h à 42°C.

La synthèse du second brin se fait par ajout au premier brin d'un second mélange réactionnel incubé pendant 2h30 à 16°C puis stocké directement à 4°C. L'ARNm est ainsi dégradé alors que la méthylation du premier brin le protège de l'action de la RNase H, permettant la synthèse du brin complémentaire.

La préparation des ADNc pour le clonage nécessite une étape de fixation des extrémités des ADNc, l'ajout d'adaptateurs EcoRI aux extrémités et leur phosphorylation, ainsi qu'une digestion par l'enzyme de restriction XhoI (cf. figure 16). La synthèse de chaque brin est vérifiée. Chaque aliquot contrôle est déposé puis migre dans un gel d'agarose alcalin à 100V à 4°C. Après autoradiographie et incubation sur la nuit, les résultats sont lus avec le lecteur « Molecular Imager PharoFX Plus System » (Biorad Laboratories, Inc.).

Figure 16 : Synthèse de la banque d'ADNc.



## 2. Fractionnement par taille des ADNc.

Les ADNc sont purifiés en fonction de leur taille sur une colonne de sépharose « Sepharose CL-2B gel filtration ». Les échantillons sont déposés sur la colonne et purifiés à température ambiante. Lors de l'élution, environ 100µl sont récupérés par tube, soit 18 tubes au total. Un aliquot de 8 µl de chaque tube est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif de concentration 5%. La révélation se fait par autoradiographie comme précédemment. Les ADNc contenus dans les différentes fractions retenues sont purifiés avec du phénol/chloroforme 1 :1, précipités à l'éthanol absolu et conservés à -20°C. Le culot d'ADNc est remis en suspension dans 5µl d'eau stérile et la concentration est déterminée par spectrométrie.

## 3. Transformation bactérienne des vecteurs recombinants pTRG.

Les ADNc (5µl) sont incubés sur la nuit à 12°C avec le plasmide pTRG prédigéré (pTRG-XR), le couple d'enzyme EcoRI/XhoI et la T4 DNA ligase. Le produit de ligation ainsi obtenu est transformé dans la souche XL1 blue MRF' Kan. Les bactéries sont incubées avec du β-mercaptoethanol puis avec les plasmides pTRG contenant les ADNc avant un choc thermique de 50sec à 42°C. La culture est ensuite étalée sur milieu LB-agar-tétracycline 25µg/ml et incubée pendant 24h à 30°C.

## 4. Obtention de la banque.

Les bactéries sont récupérées manuellement par ajout de 2ml de SOC par boîte de culture. Un aliquot de 2µl et de 5µl sont déposés sur milieu LB-agar-tétracycline 25 µg/ml et incubées sur la nuit à 30°C afin de déterminer la taille de la banque d'ADNc. La formule suivante est utilisée :

$$\text{Nombre de colonies} = \frac{(\text{nombre de colonies sur la boîte}) \times (\text{volume total de culture})}{(\text{Volume de culture étalé sur la boîte})}$$

La moitié de la culture est utilisée pour extraire l'ADN plasmidique et la seconde moitié est utilisée pour conserver la banque sous forme de glycérol stock à -80°C. L'ADN plasmidique extrait est dosé par spectrométrie et conservé à -20°C. Une PCR est réalisée afin de vérifier la taille des ADNc de la banque. Les plasmides (35ng) sont ajoutés au mélange réactionnel de PCR suivant : dNTPs 0,4 µM, amorces pTRG\_F (5'-

TGGCTGAACAACACTGGAAGCT-3') et pTRG\_R (5'-ATTCGTCGCCCCGCCATAA-3') de concentration finale 0,4  $\mu$ M, Taq DNA polymerase (1U). Les cycles sont les suivants : 1 cycle (94°C 1min) et 30 cycles (94°C 30sec, 56°C 30sec, 72°C 2min) ; Le produit obtenu est analysé par gel d'agarose 1% et révélé par coloration au BET.

### III. Faisabilité de la méthode.

Deux conditions sont nécessaires pour réaliser un double hybride bactérien. D'une part la protéine appât doit être produite et d'autre part celle-ci ne doit pas induire seule une activation de la transcription du gène rapporteur (« self activation »).

#### 1. Vérification de la production recombinante.

Le plasmide recombinant pBT est transformé dans la souche bactérienne « Bacteriomatch II validation reporter competent cells » et les bactéries sont étalées sur milieu LB-agar-chloramphénicol 25 $\mu$ g/ml. Les bactéries transformées vérifiées sont mises en culture dans 2ml de milieu minimum M9+ His-dropout (milieu M9) contenant 25 $\mu$ g/ml de chloramphénicol jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> à 0,6. Un aliquot de 20 $\mu$ l de culture est prélevé et la production recombinante est alors induite par ajout d'IPTG de concentration finale 100 $\mu$ M pendant 2h à 37°C sous agitation à 225rpm et un aliquot de 20 $\mu$ l est prélevé.

Les aliquots de culture induite et non induite par IPTG sont mélangés avec 20 $\mu$ l de tampon de charge des protéines concentré deux fois (SB2X), incubés 10min à 100°C et déposé sur gel de polyacrylamide dénaturant (acrylamide-bisacrylamide 37,5:1) de concentration 12%. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) est effectuée suivie par une immunoempreinte (« western blot »). L'électrophorèse se déroule à 70V pendant 3h puis les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, 0,45 $\mu$ m, Millipore) pendant 30min à 25V (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad Inc.). Après lavage de la membrane au TBS-Tween 0,05%, la membrane est saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de TBS-Tween-0,05%-BSA-5% sous agitation puis hybridée sur la nuit en rotation à 4°C avec une solution d'anticorps primaire de lapin anti- $\lambda$ cI ou d'anticorps anti-protéine d'intérêt dans du TBS-Tween 0,05%-BSA 1% (cf. annexe 2). La membrane est lavée trois fois avec du TBS-Tween 0,05%, puis hybridée pendant 45min à température ambiante avec une solution d'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de chèvre anti-anticorps de

lapin dans du TBS-Tween 0,05%-BSA 1% de concentration finale 80ng/ml (Santa Cruz Biotechnology Inc.), à nouveau lavée trois fois avec du TBS-Tween 0,05% et enfin incubée 1min à température ambiante dans la solution de révélation ECL (cf. annexe 2). La lecture se fait par le logiciel « Quantity One 1D » associé au lecteur « Molecular Imager ChemiDoc XRS System » (Biorad Laboratories, Inc.).

## 2. Test de « self activation ».

### a. Plasmides & milieux

Plusieurs couples de plasmides sont cotransformés dans les bactéries « validation reporter ». Les bactéries transformées sont étalées sur différents milieux afin de tester l'absence d'activation du gène rapporteur par la protéine appât seule.

Le tableau ci-dessous décrit les différentes combinaisons testées :

plasmide 1	plasmide 2	milieu-agar	dilution	volume déposé sur boîte
pBT recombinant	pTRG vide	milieu M9 non sélectif + choramphénicol + tétracycline	1/100e	20µl et 200µl
pBT recombinant	pTRG vide	milieu M9 sélectif + choramphénicol + tétracycline	1	200µl
pBT vide	pTRG-Gal11P	milieu M9 non sélectif + choramphénicol + tétracycline	1/100e	20µl et 200µl
pBT vide	pTRG-Gal11P	milieu M9 sélectif + choramphénicol + tétracycline	1	200µl

pTRG-Gal11P : plasmide cible recombinant contrôle

### b. Cotransformation et analyse des résultats.

Les bactéries (100µl) sont incubées avec du beta-mercaptoethanol puis avec les plasmides pBT et pTRG avant le choc thermique de 35sec à 42°C. Après incubation pendant 1h30 à 37°C sous agitation 225rpm, la culture est centrifugée et le culot est lavé deux fois avec 1ml de milieu M9 puis la culture est à nouveau incubée pendant 2h à 37°C avant d'être étalée sur les différents milieux solides comme décrit dans le tableau ci-dessus. Les bactéries sont incubées pendant 24h à 37°C avant analyse des cotransformants.

Le nombre de cotransformants est déterminé pour chaque cotransformation et le pourcentage de colonies obtenues sur milieu sélectif par rapport à celui obtenu sur milieu non sélectif est déterminé.

#### IV. Crible de la banque d'ADNc.

Le déroulement de l'identification d'un partenaire d'interaction d'une protéine appât par double hybride bactérien est schématisé sur la figure 17 (p21 est donné à titre d'exemple).

##### 1. Crible.

Les bactéries de la souche « Bacteriomatch II screening reporter competent cells » sont cotransformées par les plasmides d'intérêt et cible recombinants (pBT-x et pTRG-ADNc) selon le protocole du fournisseur décrit lors de l'étape de « self activation ». La culture est étalée sur milieu M9-agar supplémenté en chloramphénicol 25µg/ml, tétracycline 25µg/ml et 3-AT 5mM puis incubées à 37°C pendant 24h et à 20°C pendant une nuit.

Chaque colonie issue de ce crible initial est repiquée sur milieu M9-agar-chloramphénicol-tétracycline-3AT-streptomycine 12,5µg/ml et incubée à 37°C pendant 24h puis à 20°C pendant une nuit. Les colonies ainsi obtenues sont amplifiées par repiquage sur milieu LB-agar-chloramphénicol-tétracycline et incubées pendant une nuit à 30°C puis conservées à 4°C.

##### 2. Identification des ADNc.

###### a. Isolation du pTRG recombinant.

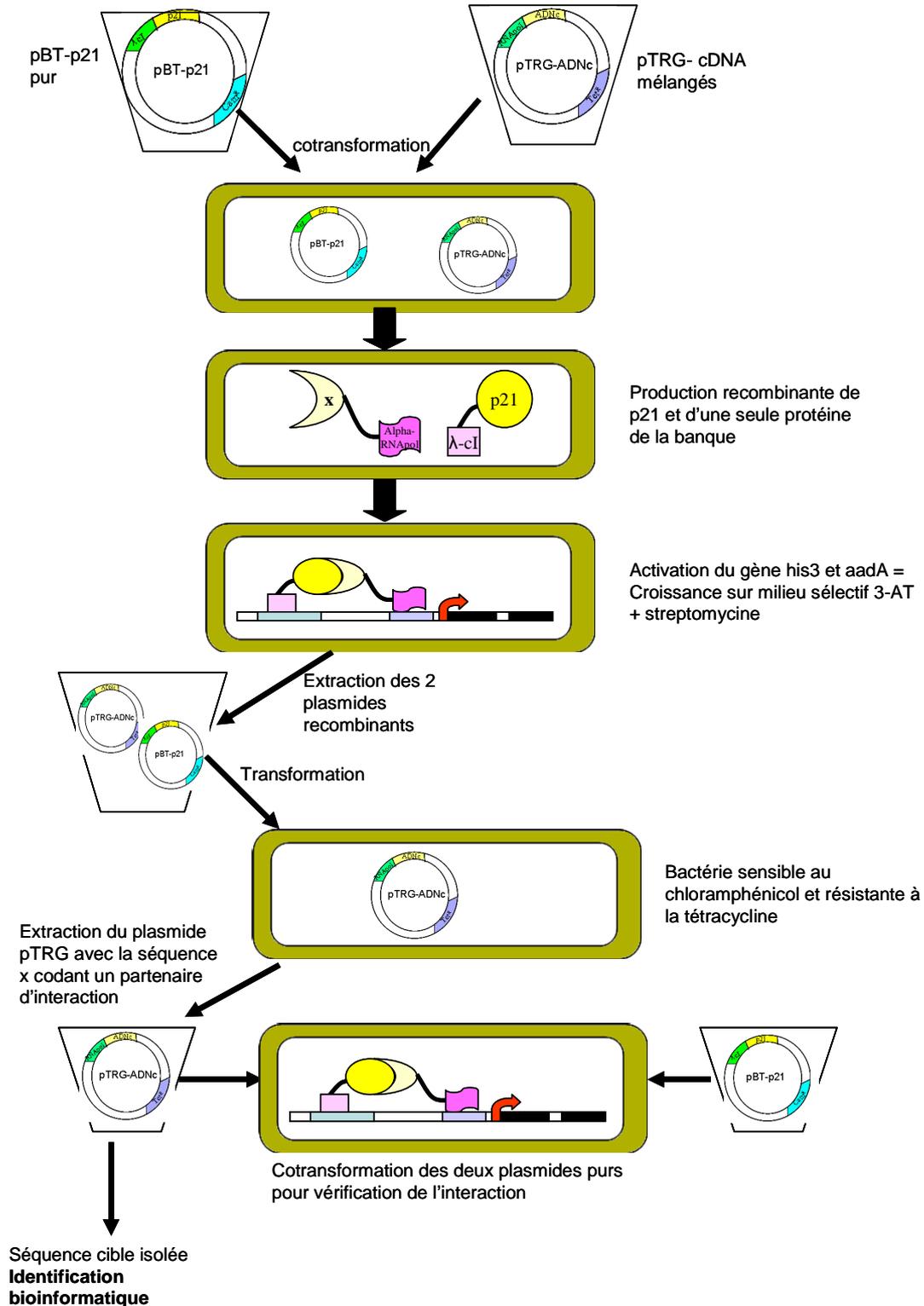
L'isolation du pTRG recombinant nécessite plusieurs étapes de sélection. Dans un premier temps, une préparation d'ADN plasmidique contenant les deux plasmides recombinants est réalisée à partir des clones positifs (cf. figure 17). Chaque préparation plasmidique est utilisée pour transformer la souche XL1 blue MRF' Kan selon qui est incubée sur la nuit à 30°C sur milieu LB-agar-tétracycline 25µg/ml. Deux colonies obtenues de chaque transformation est testée par repiquage à la fois sur milieu LB-agar-chloramphénicol et sur milieu LB-agar-tétracycline. Après incubation une nuit à 30°C, les clones sensibles au chloramphénicol et résistants à la tétracycline sont amplifiés afin d'extraire le plasmide pTRG recombinant pur.

###### b. Identification par bioinformatique.

Les plasmides recombinants pTRG-ADNc sont séquencés par l'entreprise Millegen avec l'amorce pTRG\_F (5'-TGGCTGAACAACACTGGAAGCT-3'). Chaque séquence est ensuite

identifiée par comparaison bioinformatique contre une banque de données des séquences codantes humaines (NCBI megablast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Figure 17** : Déroulement du crible de la banque d'ADNc.



## V. Vérification des interactions.

Les séquences codant des protéines impliquées dans une interaction avec la protéine d'intérêt sont conservées sous forme d'ADN plasmidique. Les clones correspondants sont remis en culture dans 2ml de LB-tétracycline pour réaliser un glycérol stock conservé à -80°C. La spécificité de l'interaction est vérifiée par une nouvelle cotransformation des plasmides recombinants dans la souche « validation reporter » selon le protocole décrit lors de la « self activation ». La culture bactérienne est induite par IPTG 1mM pendant 1h30 à 30°C. La concentration est déterminée par dosage de la DO<sub>600</sub> par spectrométrie, puis diluée 5 fois d'un facteur 2 ; 4µl de chaque dilution est déposé sous forme de goutte sur milieu LB-agar-chloramphénicol-tétracycline-streptomycine et LB-agar-chloramphénicol-tétracycline et incubée à 30°C pendant 2 jours. Parallèlement, la même expérience est réalisée avec les bactéries cotransformées avec divers couples de plasmides comme contrôles.

## VI. Applications.

### 1. Constructions des plasmides recombinants pBT-séquences appât.

Dans le cas de MtSAP1, la matrice utilisée est un plasmide porteur de la séquence complète de *MtSAP1*. Le plasmide provient d'un clone de la banque soustractive réalisée à partir d'axes embryonnaires de *Medicago truncatula* entre 6 heures et 23 heures après imbibition de la graine.

Pour le clonage de la séquence codante de p21, la matrice utilisée est constituée d'ADNc issus des transcrits de la lignée cellulaire LS180 traitée pendant 48h avec un inhibiteur de la topoisomérase I, le SN38, à une concentration finale de 10ng/ml.

Dans le cas de STAT3-Cter, une étape de sous-clonage a été nécessaire. La partie C-terminale de la séquence STAT3 (STAT3-Cter) est constituée des nucléotides n+2146 à n+2313. La séquence codante de STAT3 complète est dans un premier temps amplifiée à partir des ADNc des cellules LS180 avec les amorces Stat3\_FL\_F (5'-ATGGCCCAATGGAATCAGCT-3') et Stat3\_FL\_R (5'-TCACATGGGGGAGGTAGCG-3') et clonée dans le vecteur pGEMT-easy selon le protocole du fournisseur (Promega). Par la suite, ce plasmide recombinant est utilisé comme matrice pour la construction de la séquence de STAT3-Cter prête à être clonée dans le vecteur pBT.

Le tableau 1 ci-dessous répertorie pour chaque protéine appât les séquences des amorces et les programmes PCR utilisés dans l'amplification des séquences appâts, ainsi que les enzymes de restriction et la quantité d'ADN utilisés pour le clonage dans le vecteur pBT.

**Tableau 1** : Spécificités des clonages des séquences appât dans le plasmide pBT.

MtSAP1	
Amorce sens	MtSAP1_B2H_F : 5'- TTTGCGGCCGCAATGGAGTCGCACGATGAG-3'
Amorce antisens	MtSAP1_B2H_R : 5'- AACCTCGAGGTTTAGTGCATGGCTAGATT-3'
Programme PCR	1 x (94°C 2min), 5 x (94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec) 30 x (94°C 30sec, 62°C 30sec, 72°C 30sec).
Enzymes de restriction utilisées	en 5' : NcoI <span style="float: right;">en 3' : XhoI</span>
Quantité d'ADN pour la ligation avec un ratio 3 : 1	52ng d'ADN pour 100ng de pBT
p21	
Amorce sens	p21_B2H_F : 5'- AAATAGAATTCAATGTCAGAACCGGCTGGG-3'
Amorce antisens	p21_B2H_R : 5'- AAAGGATCCTTAGGGCTTCCTCTTGGAGAAG-3'
Programme PCR	1 x (94°C 2min), 8 x (94°C 30sec, 45°C 30sec, 72°C 1min) 27 x (94°C 30sec, 56°C 30sec, 72°C 1min)
Enzymes de restriction utilisées	en 5' : EcoRI <span style="float: right;">en 3' : BamHI</span>
Quantité d'ADN pour la ligation avec un ratio 3 : 1	55ng d'ADN pour 100ng de pBT
STAT3-Cter	
Amorce sens	STAT3-Cter_B2H_F : 5'- TTGCGGCCGCAACGACCTGCAGCAATA-3'
Amorce antisens	STAT3-Cter_B2H_R : 5'- TCCCTCGAGGGTCACATGGGGGAGGTAGCG-3'
Programme PCR	1 x (94°C 2min), 7 x (94°C 30sec, 42°C 30sec, 72°C 1min) 28 x (94°C 30sec, 64°C 30sec, 72°C 1min)
Enzymes de restriction utilisées	en 5' : NcoI <span style="float: right;">en 3' : XhoI</span>
Quantité d'ADN pour la ligation avec un ratio 3 : 1	15ng d'ADN pour 100ng de pBT

La transformation des plasmides pBT recombinants est réalisée suivant le protocole (cf. chap. 1 § I.) et est conforme au protocole du fournisseur.

## 2. Faisabilité de la méthode.

Les productions recombinantes des protéines appât fusionnées à  $\lambda$ cI sont réalisées conformément au protocole décrit précédemment (cf. chap. 1 § II.1). L'analyse des résultats se fait par western blot : dans le cas de MtSAP1 et de STAT3-Cter, l'anticorps primaire de lapin anti- $\lambda$ cI dilué au 1/2000<sup>e</sup> a été utilisé, alors que pour p21, c'est un anticorps primaire de lapin anti-p21 de concentration finale 200ng/ml (Santa Cruz Biotechnology Inc.) qui a été utilisé. Les tests de « self activation » ont été réalisés conformément au protocole décrit précédemment (cf. chap. 1 § II.2). Les plasmides pBT recombinants utilisés sont donc MtSAP1- $\lambda$ cI-pBT, p21- $\lambda$ cI-pBT et STAT3-Cter- $\lambda$ cI-pBT.

## 3. Construction des plasmides recombinants pTRG-ADNc et cribles.

Les constructions de plasmides recombinants pTRG-ADNc ainsi que le crible de la banque d'ADNc ont été réalisés conformément au protocole (cf. chap. 1 § IV.).

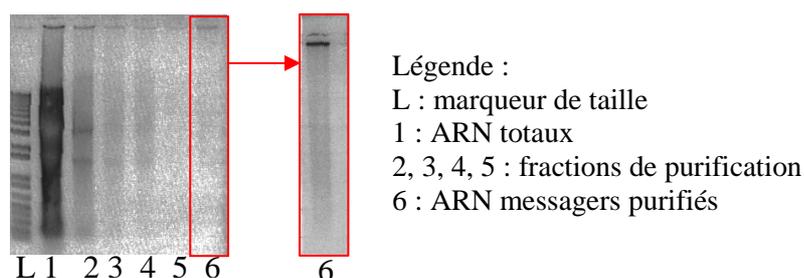
## Résultats.

Dans cette étude de double hybride, 3 protéines, MtSAP1, p21 (issue du gène *CDKN1A*) et STAT3, ont été utilisées comme appât. Parallèlement, 2 banques d'ADNc ont été réalisées pour servir de cible, l'une issue des ARNm de graines sèches de *Medicago truncatula* et l'autre issue des ARNm de la lignée cellulaire tumorale colorectale humaine LS180. Les paragraphes suivants présentent les résultats obtenus avec la construction des deux banques ; les résultats liés au double hybride spécifique de chacune des protéines sont décrits ultérieurement dans les parties correspondantes.

### I. Banque d'ADNc de lignée tumorale colorectale humaine.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cellules de la lignée tumorale colorectale LS180 puis les ARNm ont été purifiés (cf. figure 18). Dans la fraction 1 comprenant tous les ARN, les bandes majoritaires observées correspondent aux ARN ribosomiaux, éliminés totalement dans les 4 premières fractions lors de la purification. Les ARNm (fraction 6) se présentent sous la forme d'une traînée homogène, due à la grande diversité des tailles existantes, validant la qualité de l'extraction et de la purification.

Figure 18 : Purification des ARNm.



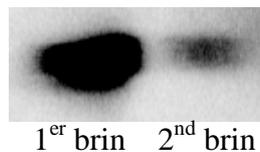
Purification des ARNm. Les ARN totaux ainsi que les différentes fractions obtenues lors de la purification ont été analysés sur gel d'agarose 1% colorés au BET. Les ARNm purifiés uniquement ont été analysés une seconde fois sur gel d'agarose à l'identique pour augmenter la résolution de l'image obtenue.

A partir de 5 $\mu$ g d'ARNm, la synthèse des ADNc a été réalisée selon le protocole décrit dans la section matériels et méthodes et analysée par autoradiographie (cf. figure 19A). Le premier brin synthétisé présente une radioactivité plus importante que le second brin,

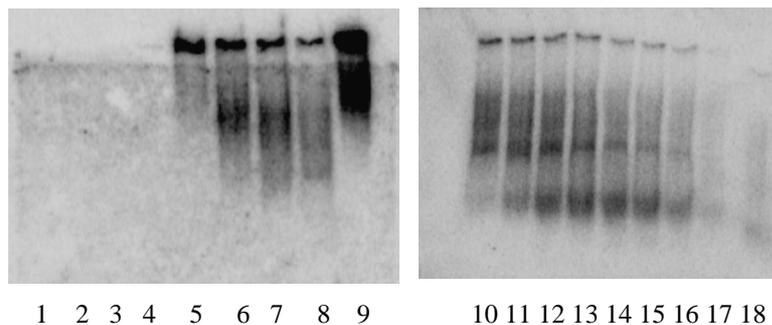
conformément aux notifications du fournisseur. Les ADN complémentaires néo-synthétisés sont séparés par fractionnement en fonction de leur taille ; chaque fraction est analysée sur gel d'acrylamide et par autoradiographie (cf. figure 19B). Les fractions comprenant les tailles d'ADNc les plus élevées sont récupérées (fractions 5 à 11) et conservées pour le double hybride.

Figure 19 : Obtention des ADNc.

*A. Synthèse des ADNc : autoradiographie des brins néosynthétisés*



*B. Fractionnement des ADNc en fonction de leur taille : autoradiographie*

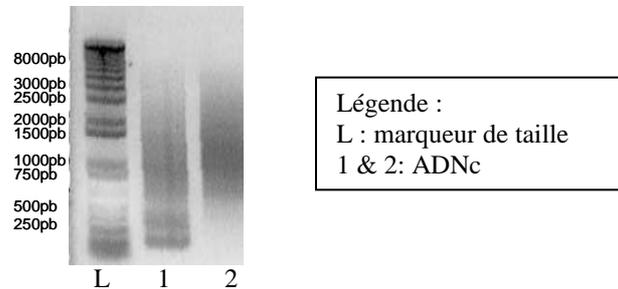


(A.) Synthèse des ADNc. Autoradiographie des deux brins d'ADNc néosynthétisés à partir des ARNm purifiés. (B.) Fractionnement des ADNc. Autoradiographie des fractions obtenues après purification selon la taille des ADNc.

Les ADNc conservés ont été insérés dans le plasmide pTRG au niveau des sites de restriction EcoRI/XhoI. De ce fait, la ligation est unidirectionnelle, tous les ADNc ont été insérés dans le sens correct pour être traduit en protéine fusionnée à  $\alpha$ RNApol. Le produit obtenu est transformé dans la souche XL1 blue MRF' Kan, constituant la banque primaire qui a été déposée sur milieu solide comprenant la tétracycline, ce qui constitue la banque amplifiée. Parallèlement, des aliquots de 2 et 5  $\mu$ l de produit transformés ont été déposés sur milieu solide afin de déterminer la taille de la banque. Tous les clones ont été regroupés, la moitié a constitué un stock et l'autre moitié a été utilisée pour réaliser une maxipréparation d'ADN plasmidique. Les tailles des ADNc insérés dans le plasmide cible pTRG ont été vérifiées par PCR sur la maxipréparation d'ADN (cf. figure 20). La banque obtenue est

constituée de 9 millions de clones contenant des ADNc de taille variant entre 600 et 3 000 pb, mais dont la majorité se situe aux environs de 1 000 pb.

Figure 20 : Estimation de la taille des ADNc de la banque



Deux matrices ont été utilisées pour réaliser deux PCR avec le couple d'amorce s'hybridant sur le plasmide pTRG au niveau de l'insertion des ADNc : le produit de ligation (ligne 1) avant transformation bactérienne et la maxipréparation d'ADN plasmidique issue de la banque amplifiée (ligne 2).

## II. Banque d'ADNc de graines sèches de *Medicago truncatula*.

Afin de faciliter la lecture, les résultats correspondants aux étapes de construction de la banque ne sont pas décrits, parce qu'ils sont identiques à ceux obtenus lors de la construction de la banque d'ADNc humaine.

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'axes embryonnaires de graines de *Medicago truncatula* durant la phase de quiescence (graines sèches). Trois cent graines sèches du génotype Parragio ont été disséquées et les axes embryonnaires ont été isolés des cotylédons, des enveloppes et de l'albumen. Les axes embryonnaires ont été broyés au mortier dans l'azote liquide et les ARN totaux ont été extraits. Les ARNm ont par la suite été purifiés.

Les ADNc conservés ont été insérés dans le plasmide pTRG au niveau des sites de restriction EcoRI/XhoI. Après ligation et transformation dans la souche XL1 blue MRF' Kan, la banque amplifiée est obtenue. La banque est constituée de 5 millions de clones contenant des ADNc de taille variant entre 400 et 1 500pb.

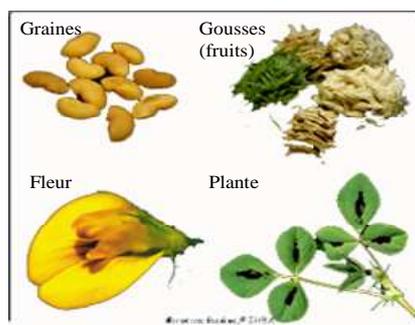
**CHAPITRE 2 :**  
**INTERACTIONS PROTEINIQUES :**  
**APPLICATION EN AGRO-ALIMENTAIRE.**  
**EXEMPLE DE MtSAP1.**

## Avant-propos.

En France, l'agriculture en 2004 représentait 2,5% du PIB total ; en comparaison, celle des Etats-Unis ne représente que 1,5% ([www.statistiques-mondiales.com](http://www.statistiques-mondiales.com)). La France est le premier producteur européen de semences, le troisième exportateur mondial et son chiffre d'affaire total s'élevait à environ 2 milliards d'euros en 2005/2006 ([www.gnis.fr](http://www.gnis.fr)). La balance commerciale est positive depuis 15 ans et en constante progression. Afin de s'adapter aux directives de l'union européenne sur la qualité et la sécurité des produits et aux exigences du marché, la filière agricole et la recherche française s'intéressent particulièrement à l'amélioration des semences en tant que produit fini comme en tant que future plante. Parmi les espèces cultivées, les légumineuses ou fabacées occupent une place importante. Elles sont utilisées comme fertilisant en agriculture, les pois, haricots et lentilles sont destinés à l'alimentation humaine, l'arachide et le soja sont source d'huile et la luzerne et le trèfle sont utilisés pour l'alimentation animale.

L'azote est l'élément le plus important pour la vie de la plante car il est un acteur primordial de la photosynthèse. Les plantes utilisent le nitrate ( $\text{NO}_3$ ) puisé dans le sol comme source d'azote. Les légumineuses sont capables en plus de filtrer l'azote gazeux atmosphérique, et ce grâce aux bactéries symbiotiques rhizobium. *Medicago truncatula*, ou luzerne tronquée, est une herbacée des régions méditerranéennes et s'est imposé comme le modèle d'étude des légumineuses (cf. figure 21). *Medicago truncatula* est une petite plante produisant de petites graines en abondance, son temps de génération est court, de 10 à 12 semaines, et est autogame, permettant une homogénéité des populations génétiques. Enfin, le génome est diploïde et de petite taille (450 Mb). Un site internet dédié regroupe les informations sur la plante ([www.medicago.org](http://www.medicago.org)).

Figure 21 : *Medicago truncatula*.



Réf. : <http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/medi/index.jsp>.

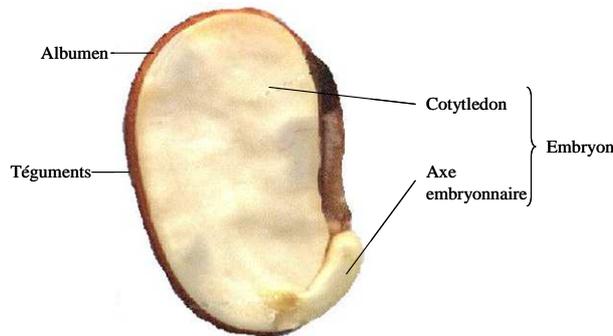
## Introduction.

Le pôle de compétitivité « végétal spécialisé » des Pays de la Loire a été reconnu comme projet à vocation mondiale. L'unité mixte de recherche « physiologie moléculaire des semences » situé en Anjou est un des instituts de recherche de ce pôle. L'objectif des recherches qui y sont menées est d'acquies une meilleure compréhension de la physiologie des semences en vue d'en améliorer la qualité.

### I. Vision générale.

La graine est la structure qui contient et protège l'embryon végétal. Elle est composée de membranes protectrices, les téguments, de réserves nutritionnelles, l'albumen, et de l'embryon. L'embryon est lui-même composé de cotylédon et de l'axe embryonnaire ; ce dernier constituera les racines et la tige (cf. figure 22). Dans cette étude la graine est considérée comme une semence, point de départ crucial du développement de la plante.

Figure 22 : Anatomie d'une graine.



Les recherches sur la germination différencient la germination proprement dite de l'établissement de la plantule. Ici la germination est donc définie comme un processus intervenant à partir de l'imbibition de la graine et conduisant à la percée de la radicule hors des téguments.

Chez *Medicago truncatula*, la morphogénèse, correspondant au développement de l'embryon, dure 12 jours à partir de la pollinisation (JAP). S'en suit la maturation de la graine, où l'embryon se développe et la chlorophylle et les substances de réserves synthétisées sont stockées. La maturation correspond également à l'acquisition du pouvoir germinatif, vers 14 JAP, et à la mise en place des processus inhérents au potentiel de conservation, entre 16

JAP et 20 JAP [112]. Comme nous l'avons dit précédemment, la qualité d'une semence est définie par la capacité d'une graine à produire une plante saine et vigoureuse. Cette capacité est liée au potentiel de conservation qui correspond à la tolérance à des stress comme la dessiccation, les basses températures ou l'hypoxie, et à la levée de la dormance, c'est-à-dire la reprise de la croissance au cours de la germination.

## II. Germination et stress.

Dans le cas des espèces cultivées, des mécanismes sont mis en place pour permettre à la graine d'entrer dans une phase de quiescence indispensable avant la germination. En effet, dans le cas contraire, la germination aurait lieu avant la saison froide, exposant la jeune plantule aux gelées. Les mécanismes inhérents à ce processus, tolérance à la dessiccation et dormance, sont mis en place durant la maturation de la graine.

### 1. Tolérance à la dessiccation.

La tolérance à la dessiccation permet d'assurer la quiescence lors de laquelle l'hydratation et le métabolisme sont extrêmement réduits. Elle est définie comme la capacité à survivre après un séchage à l'air [113,114] et permet à l'organisme de résister à des conditions environnementales extrêmes : humidité relative ambiante nulle, température très basse, vide et radiation ionisantes [115,116].

Des mécanismes de protection sont mis en place dans les tissus des graines au cours de la maturation afin de protéger les structures cellulaires des dommages causés par le retrait de l'eau. Il y a une accumulation de sucres, des composés amphiphiles et de protéines spécifiques : « Heat Shock Protein » (HSP) et « Late Embryogenesis Protein » (LEA). Le métabolisme cellulaire est également ajusté pour éviter l'accumulation de composés réactifs de l'oxygène (ROS) et d'acétaldéhyde. Les sucres non réducteurs ont un rôle d'osmoprotectants et permettent la préservation des membranes et des composants macromoléculaires des cellules [117,118]. Les composés amphiphiles (antioxydants, flavonoïdes) maintiendraient une fluidité membranaire à l'état sec [119-121]. Les protéines LEA sont accumulées au cours des phases tardives de la maturation des semences [122,123] et en réponse à divers stress abiotiques [124-126]. Leur mode d'action n'est pas clairement élucidé mais plusieurs hypothèses ont été émises : séquestration d'ions [127], prévention de l'agrégation des macromolécules [128], stabilisation de l'état vitreux créé par l'accumulation

des sucres non réducteurs [129,130] et formation de microfilaments stabilisateurs du cytosquelette [131]. Les protéines HSP ont été identifiées chez les graines soumises à un stress thermique [132]. Elles sont également accumulées à la fin de la maturation et leur présence est corrélée à la tolérance à la dessiccation chez *Arabidopsis thaliana* [133]. Elles pourraient jouer un rôle de chaperonne pour éviter la dénaturation et l'agrégation des protéines. L'intensité du métabolisme est corrélé à la tolérance à la dessiccation [134] et pourrait alors jouer un rôle dans la réduction de la production de ROS. Le métabolisme étant faible, la transition vers un métabolisme fermentaire toxique serait donc évitée.

## 2. Dormance.

La dormance est une caractéristique spécifique des graines qui peut se définir comme le blocage de la germination d'une graine intacte et viable malgré des conditions environnementales favorables [135]. Ceci représente une adaptation empêchant la germination spontanée qui pourrait survenir trop précocement. La dormance peut prendre différents aspects selon les espèces. Baskin et Baskin ont proposé un système de classification qui compte cinq classes de dormance : physiologique, morphologique, morphophysique, physique et combinée physiologique/physique [136].

La dormance physiologique est la forme la plus répandue et concerne une grande partie des espèces cultivées et dites « de laboratoire » comme *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*. Les recherches sur la compréhension de la dormance sont donc essentiellement focalisées sur la dormance physiologique. C'est pourquoi seule celle-ci est détaillée ci-après. La dormance primaire correspond à l'état des graines fraîchement récoltées et est initiée par l'acide abscissique endogène produit par l'embryon au cours de la maturation [137,138]. Cet état disparaît progressivement lors du stockage dans des conditions sèches ou grâce à des traitements imposés à la graine imbibée : stratification par le froid ou le chaud, lumière (pour les espèces concernées) et autres hormones [138], les buténolides [139], et l'oxyde nitrique [140,141]. La dormance secondaire intervient lorsque les conditions nécessaires à la perte de la dormance primaire ou l'induction de la germination ne sont pas remplies. Cette dormance est levée lorsque les conditions sont remplies mais peut être induite à nouveau [135].

### 3. Quiescence.

La quiescence est un type de dormance dépendant exclusivement des conditions du milieu de vie de l'organisme ou de la cellule considérée. C'est une réponse directe à une dégradation de l'environnement. Elle est différente de la dormance vraie dans le cas des graines où il faut des phénomènes précis et ordonnés pour qu'il y ait levée de dormance.

La phase de quiescence s'installe progressivement à la fin du processus de maturation, correspondant à une déshydratation importante de la graine, et dure tant que la graine n'est pas dans des conditions physiologiques et environnementales qui permettent la germination. La longévité des graines correspond à la durée maximale de la phase de quiescence, la graine perdant sa capacité germinative au-delà de cette durée. Les conditions de l'environnement qui permettent la germination sont une hydratation et une oxygénation suffisantes ainsi qu'une température correcte (qui dépend de l'espèce considérée). Si ces conditions ne sont pas remplies, la graine ne germe pas et peut entrer en phase de dormance secondaire. La levée de dormance primaire survient spontanément lorsque la graine est restée quiescente. La durée nécessaire pour la levée de dormance dépend des conditions de l'environnement durant la maturation de la graine sur la plante mère mais également des conditions de stockage [142]. Une humidité, même très faible ou dans des zones localisées de la graine serait nécessaire à la levée de dormance [143].

La transcription est effective dans les graines au stade quiescent chez le tabac [143,144] et l'orge [145]. Les ARNms transcripts sont très nombreux et serviraient à une synthèse rapide des protéines nécessaires au moment de la germination. La plupart codent des protéines du métabolisme cellulaire et protéique [146] qui prépareraient la graine à la germination [147]. Ces protéines peuvent être néosynthétisées ou stockées dans la graine depuis la fin de la maturation. Il est à noter que l'inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide bloque la germination [148], démontrant leur importance capitale dans ce processus.

### 4. Germination.

La germination est définie comme la phase transitoire entre le stade graine sèche et l'apparition de la radicule hors des téguments [149]. Elle débute avec l'imbibition des tissus. Lorsque les conditions de l'environnement sont favorables, le développement de l'embryon reprend. L'axe embryonnaire s'allonge alors dans les deux sens. La partie distale de l'axe

embryonnaire qui permet au méristème racinaire de s'enfoncer pour développer des racines est la première à se développer au cours de la germination chez *Medicago truncatula*. Lors de la germination, les tissus dans un premier temps se réhydratent rapidement. Ensuite, il y a un ralentissement de la prise d'eau et de l'activité respiratoire. C'est à ce stade que se préparent les événements métaboliques associés à l'allongement de la radicule. L'émergence de la radicule clôt cette deuxième étape et coïncide avec la perte de la tolérance à la dessiccation. La troisième et dernière phase, dite de croissance, correspond à l'allongement de la radicule ; elle amorce la mobilisation des réserves et le développement de la plantule et n'est donc pas considérée comme faisant partie de la germination au sens strict.

La germination est donc soumise aux conditions de l'environnement (présence d'eau et d'oxygène). La cinétique de germination est régulée par la température et l'éclairement, l'optimum variant d'une espèce à l'autre selon le milieu auquel elle est adaptée. Pour *Medicago truncatula*, cet optimum se situe à 21°C et à l'obscurité.

## 5. Régulation de la maturation et de la germination.

Les acteurs de la régulation de ces événements sont étroitement liés. Les hormones, en particulier l'acide abscissique et les gibbérellines y jouent un rôle prépondérant (cf. figure 23).

### a. Les hormones.

Plusieurs hormones interviennent dans le contrôle de la germination. Cependant, l'acide abscissique (ABA) et les gibbérellines (GA) sont les deux hormones principales dont les fonctions sont antagonistes.

#### i. L'acide abscissique.

L'ABA exerce un contrôle sur la maturation de la graine et est responsable de l'induction et du maintien de l'état de dormance primaire (cf. figure 23). L'ABA, dérivé des caroténoïdes, est synthétisé dans un premier temps dans le chloroplaste puis dans le cytosol. C'est un répresseur de la germination [135] ; un apport exogène provoque une inhibition de la germination, bien que le phénotype observé ne corresponde pas à celui de la dormance [147,150-152]. Le métabolisme de l'ABA, contrôlant sa concentration intracellulaire, joue un rôle important dans la réponse à l'environnement et dans le processus de développement.

La perception de l'ABA par les cellules est indéterminée et la transduction du signal de l'ABA est modulée par divers facteurs. La voie de signalisation de l'ABA implique l'action de facteurs de transcription (ABI3, ABI4, ABI5) [153-155], la dégradation de protéines [156] et la modulation de l'activité de phosphatases et de kinases.

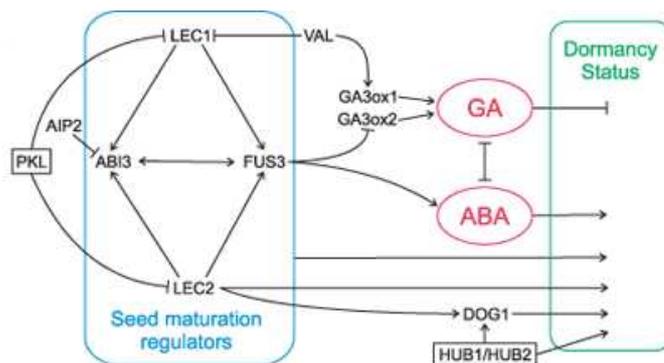
ii. L'acide gibbérellique.

La seconde hormone principale impliquée dans la germination est l'acide gibbérellique (GA). Elle est nécessaire pour l'accomplissement de la germination (cf. figure 23) et les mutants déficients en GA sont incapables d'accomplir cette phase de développement. Les enzymes de la synthèse de GA sont exprimées surtout dans les axes embryonnaires durant la germination chez *Arabidopsis thaliana* et leur délétion entraîne une diminution de la capacité germinative [157]. La transduction du signal de GA présente une particularité par rapport aux voies classiques de signalisation décrites chez les mammifères : le récepteur du GA (GID1 ; « gibberellin-insensitive DWARF1 ») activé interagit avec les protéines DELLA (répresseurs du signal GA) qui sont alors dégradées, permettant ainsi la transmission du signal [158].

iii. Autres.

D'autres hormones agissent sur la germination. Les brassinostéroïdes ont un effet positif sur la germination mais d'une manière indépendante du GA [159]. L'éthylène exerce aussi une action sur la levée de dormance et la germination en inhibant le signal de l'ABA [160]. L'auxine semble également jouer un rôle dans la germination, alors qu'elle avait longtemps été considérée comme inactive à ce stade de développement. Elle est présente dans l'extrémité de la racicule avant la germination [161] et dans l'embryon à la fin de l'embryogénèse [162].

Figure 23 : Régulation de la germination.



Réf.: [163] Holdsworth MJ, Bentsink L *et al.* Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *The New Phytologist* (2008) 179 (1) : 33-54.

## b. Régulation moléculaire.

L'étude de mutants d'*Arabidopsis thaliana* présentant des perturbations dans le programme de maturation des graines a permis la découverte de 4 facteurs de transcription majeurs impliqués dans la maturation de la graine : FUSCA 3 (FUS3), ABA INSENSITIVE 3 (ABI3) et « LEAFY COTYLEDONS » 1 et 2 (LEC1 et LEC2) [164] (cf. figure 23). Ces mutants présentent une expression réduite des gènes codant pour les protéines de maturation [165] et une dormance moins profonde, voire une absence de quiescence. ABI3, FUS3 et LEC2 sont des facteurs de transcription à domaine B3 [166-168] et LEC1 est la sous-unité HAP3 du facteur de transcription CBF (« CCAAT-binding factor ») [169]. Les protéines LECs et FUS3 agissent de manière synergique avec le facteur de transcription ABI3 [170,171] et en particulier LEC1 est nécessaire pour le développement dans les phases d'embryogénèse [169]. La protéine ABI3 est spécifique des graines et intervient dans la voie de signalisation de l'ABA en interagissant avec les séquences ABRE (« ABA Responsive Element ») situées dans les régions promotrices des gènes régulés par l'ABA [172,173], expliquant le phénotype insensible à l'ABA des mutants *abi3*. Les protéines LEC2 et FUS3 sont des facteurs de transcription qui ont pour cible les motifs RY/Sph présents dans les éléments de régulation des gènes codant des protéines spécifiques des graines [174,175]. Dans les cotylédons, LEC1 régule ABI3 et FUS3 [171], et LEC2 régule FUS3 [176]. ABI3 et FUS3 se régulent mutuellement et présentent des boucles de rétrocontrôle positif sur leur propre expression [171].

Le système de régulation de la maturation (cf. figure 23) est complexe et fait intervenir principalement les hormones GA et ABA. Il existe une relation entre le système des régulateurs de maturation et les hormones ABA et GA *via* les protéines FUS3 et LEC1. FUS3 affecte la synthèse des enzymes responsables de la biosynthèse de GA [177] et est responsable d'une augmentation du taux d'ABA [178]. La protéine LEC2 stimule l'inactivation de GA [174] et régule la transcription de *dog1* (« delay of germination 1 ») ; ce gène n'a pas de fonction connue mais il joue un rôle crucial dans la dormance, le mutant *dog1* étant complètement non-dormant. La protéine DOG1 est spécifique des graines et disparaît après l'imbibition [179].

De manière générale la modification de la chromatine est un type de contrôle important pour la régulation du développement de la graine [180,181].

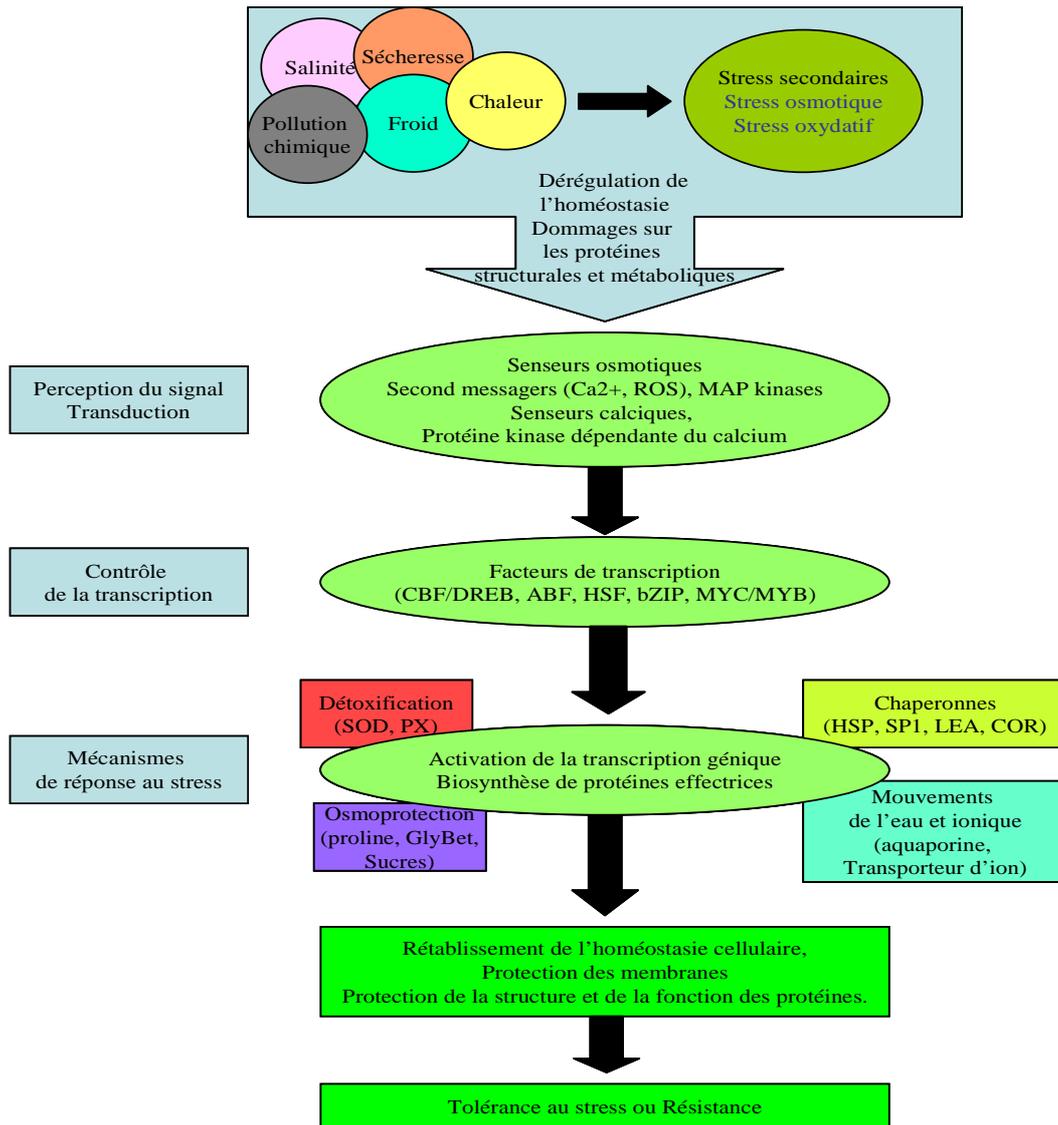
## 2. Stress abiotiques.

Les stress abiotiques subis par une plante sont définis comme tout changement de condition environnementale. Ils s'opposent aux stress biotiques dus aux infections bactériennes, virales ou fongiques. Les stress abiotiques constituent une cause majeure de perte de rendement, pour tout type de culture, au sein de divers environnements. Les plantes, organismes inféodés à leur milieu, ont des capacités plus ou moins étendues à tolérer des épisodes climatiques extrêmes. Certaines espèces ou variétés sont capables de continuer à croître et à se reproduire dans des conditions physiques qui s'écartent des moyennes habituelles en utilisant la plasticité de leur génome. D'autres restreignent leur cycle de vie dans une gamme de paramètres moins étendue ; elles sont adaptées à un milieu particulier. Cette diversité de comportements est exploitée pour mettre en exergue et comprendre les mécanismes de tolérance aux stress abiotiques que sont le froid, la sécheresse et le stress osmotique. Pour améliorer l'adaptation des plantes cultivées à leurs espaces de culture une meilleure connaissance des voies de signalisation des stress, de leurs régulations et de la réponse des effecteurs est indispensable.

Les processus d'adaptation de la cellule végétale sont nombreux. L'ABA et l'éthylène sont impliqués dans ces réponses [182,183], mais c'est en particulier l'ABA qui est le médiateur des réponses physiologiques aux stress abiotiques et biotiques dans la plupart des tissus [165]. Après transduction du signal, le calcium est un médiateur tout aussi important de la signalisation intracellulaire en tant que second messager. Suite à la cascade d'activation des protéines de signalisation, les facteurs de transcription activés induisent l'expression de gènes spécifiques (cf. figure 24). Les facteurs de transcription induits par l'ABA reconnaissent et se fixent sur des séquences spécifiques de type « cis-acting » : séquences ABRE (« ABA-responsive elements »), CE3 (« coupling-element-like sequence »), RY/Sph et les séquences de reconnaissance des facteurs de transcription des classes MYB et MYC [184,185]. D'autres paramètres sont modifiés au cours de la réponse à l'ABA, dont la conductivité ionique membranaire et le potentiel redox.

La perception d'un stress abiotique par la cellule végétale mène à l'activation de protéines spécifiques effectrices, qui peuvent être groupées en 4 catégories majeures (cf. figure 24) : protéines de signalisation et de contrôle de la transcription, protéines de choc thermique et chaperonnes, protéines du potentiel redox et protéines du transport hydrique et ionique. La signalisation intracellulaire aboutit à l'activation de nouvelles protéines effectrices.

Figure 24 : Réponse cellulaire aux stress abiotiques.



Les stress primaires (sécheresse, salinité, froid) sont souvent interconnectés et causent des dommages cellulaires ainsi que des stress secondaires, comme les stress osmotiques et oxydatifs. Les signaux de stress initiaux (par exemple les effets ioniques et osmotiques ou les changements de température ou de fluidité membranaire) activent les voies de signalisation et le contrôle de la transcription, induisant les mécanismes de réponse au stress afin de rétablir l'homéostasie et protéger puis réparer les membranes et protéines. Une réponse inadéquate à une étape peut induire des changements irréversibles menant à la mort cellulaire. Abbreviations: ABF, "ABRE binding factor"; bZIP, "basic leucine zipper transcription factor"; CBF/DREB, "C-repeat-binding factor/ dehydration-responsive binding protein"; COR, "cold-responsive protein"; Hsp, "heat shock protein"; LEA, "late embryogenesis abundant"; MAP, "mitogen-activated protein"; PX, "peroxidase"; ROS, "reactive oxygen species"; SOD, "superoxide dismutase"; SP1, "stable protein 1".

*Réf.* : [183] Vinocur, B. and A. Altman, Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology, 2005. 16(2): p. 123-132.

La régulation transcriptionnelle des gènes semble être le processus majeur ; cependant, de plus en plus de travaux impliquent une régulation post-transcriptionnelle. Par exemple, l'annexine 1, impliquée dans la réponse au stress osmotique dans les racines *d'Arabidopsis thaliana*, est régulée positivement après un stress. Cette régulation est post-traductionnelle : le taux d'ARNm est constant alors que le taux de protéine augmente. De plus, l'annexine 1 est transloquée du cytoplasme vers le noyau [186].

Les protéines de choc thermique (HSPs) et les protéines LEA sont très impliquées dans la réponse aux stress. Elles protègeraient la cellule en contrôlant la conformation des protéines, qui peut être affectée par la chaleur, la sécheresse ou la salinité [187]. La variation du potentiel redox en particulier est un acteur important de la réponse moléculaire des plantes aux stress abiotiques, modifiant les processus de développement [188,189]. Les stress abiotiques produisent des réactifs libres de l'oxygène (ROS : « reactive oxygen species »), perturbant l'homéostasie cellulaire et créant des dommages oxydatifs. La surexpression d'antioxydants ou de chélateurs permet d'accroître la résistance des plantes à divers stress, déshydratation, salinité, métaux lourds ou peroxyde d'hydrogène [190-192]. Les stress sévères peuvent être nuisibles aux compartiments cellulaires. La protection cellulaire dans ce cas nécessite l'action de métabolites : acides aminés, amines, sucres et sucres portant un groupement alcool. Capell *et al.* propose l'hypothèse de 2 stratégies de protection : augmentation de la production des produits d'intérêt ou réduction du taux de composés toxiques [193]. Parmi les acides aminés, la proline s'accumule sous stress salin et aurait un effet protecteur en induisant l'expression de protéines protectrices comme des enzymes anti-oxydantes, des ubiquitines et des déhydrines [194]. Les polyamines jouent un rôle dans la protection contre les stress salins, et notamment, la glycine-bétaïne est un osmoprotectant [187]. Enfin, la cellule mobilise des sucres en réponse aux stress salins et hydriques. Le tréhalose et le mannitol sont les 2 sucres principaux impliqués [195,196].

## II. Objectifs de l'étude.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la maturation de la graine est une étape essentielle du développement, permettant à la semence de survivre à des conditions environnementales défavorables. La maturation comme la germination sont soumises à une régulation hormono-dépendante, notamment par l'ABA, capable d'induire l'expression de protéines spécifiques, dont les protéines associées au stress (SAP).

L'équipe d'accueil du laboratoire Physiologie Moléculaire des Semences se focalise sur l'étude de la germination chez *Medicago truncatula*. La recherche des facteurs moléculaires du contrôle de la germination et des mécanismes inhérents à la tolérance aux stress de la graine a mené l'équipe à concevoir une banque d'hybridation suppressive et soustractive (SSH) [197]. Ce type de banque permet de cloner les marqueurs de séquences exprimées (EST : « expressed sequence tags ») de gènes exprimés différemment entre 2 conditions. Deux populations d'ARNm ont été extraites à partir de 2 durées d'imbibition, 6h et 23h, c'est-à-dire à la fin de prise d'eau massive par la graine et 2h après la percée de la radicule, qui marque la fin de la germination *stricto sensus*.

Le gène *MtSAP1* (*Medicago truncatula* « Stress-Associated Protein 1 ») a été découvert grâce à la banque SSH et appartient à la famille des SAPs. Dans ce chapitre, nous nous sommes d'abord intéressés à la description de la structure du gène et de son expression dans la graine en réponse à différents facteurs. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis présentés dans la première partie. Dans une seconde partie, nous avons réalisé un double hybride bactérien de *MtSAP1* afin de mettre en évidence ses partenaires d'interaction, permettant d'appréhender ses fonctions.

## **Partie 1 : MtSAP1 : organisation et expression dans l'axe embryonnaire.**

### **I. Introduction.**

La banque SSH que l'équipe a réalisée a permis de mettre en évidence toute une série de gènes dont l'expression varie entre la phase pré-germinative et la phase post-germinative. L'ensemble des gènes a été testé pour leur réponse à divers stress hormonaux et environnementaux : ABA, GA, ACC (précurseur de l'éthylène), lumière et hypoxie. Les tests ont été effectués en utilisant des réseaux de moyenne densité, plus connus sous le nom de « puces à ADN » (données non publiées).

Le gène *MtSAP1* s'est révélé fortement surexprimé par les conditions ABA et sous-exprimé par la condition ACC. L'ABA inhibant très fortement la germination, nous avons émis l'hypothèse que *MtSAP1* jouerait un rôle dans le contrôle de la germination et plus spécifiquement, aurait une fonction inhibitrice. Cette hypothèse est renforcée par la sous-expression du gène sous ACC, condition qui favorise la germination. Elle est également renforcée par la structure prédite de la protéine pour laquelle code *MtSAP1* qui contient deux domaines de type zinc-finger (« doigts de zinc »).

Toutes les protéines en doigt de zinc contribuent fortement à la protection contre les stress environnementaux [198-200]. Depuis quelques années, la famille SAP, pour "stress-associated protein", est de plus en plus étudiée, et sont caractérisées par la présence d'un domaine A20 et/ou AN1. Le domaine A20 a été identifié dans une protéine humaine des cellules endothéliales de la veine ombilicale dont l'expression est induite par la cytokine TNF $\alpha$  (« tumor necrosis factor alpha ») et qui inhibe l'apoptose induite par celui-ci [201,202]. Le domaine AN1 a initialement été caractérisé dans une protéine homologue aux ubiquitines chez *Xenopus laevis* [203]. Les fonctions exactes de ce domaine n'ont pas été clairement définies.

Les protéines SAP sont conservées dans plusieurs organismes et sont des composants de la réponse aux stress. Une analyse de Vij et Tyagi en 2008 a répertorié les protéines de type A20/AN1 chez divers organismes et notamment chez les plantes. Toutes les espèces contiennent entre 1 et 19 protéines de ce type. L'Homme en synthétiserait 7, *Arabidopsis thaliana* 14, le riz 18 et la tomate 13 [204-206]. Chez les mammifères, elles modulent des fonctions diverses dont la réponse immunitaire et le développement des cellules musculaires [109,207-209]. Chez les plantes, seules de récentes études donnent quelques informations sur

les protéines SAP. Mais toutes soutiennent une fonction critique de ces protéines dans la tolérance au stress chez les plantes [200,205,210,211].

Les mécanismes conférant aux protéines SAP un rôle majeur dans la tolérance aux stress sont encore indéterminés. Toutefois, SAP12, un des 14 membres de la famille chez *Arabidopsis thaliana*, présentant 2 domaines AN1 en doigt de zinc, subit des changements conformationnels majeurs dépendant des conditions redox, ce qui suggère une fonction de SAP12 en lien avec l'état redox de la cellule, particulièrement en condition de stress [212]. Or comme nous l'avons vu précédemment, l'état redox de la cellule est un acteur important de la réponse moléculaire des plantes, modifiant les processus de développement [188,189].

Dans cette partie sont présentés les résultats obtenus après étude systématique du gène *MtSAP1*. Cette étude correspond à la description de la structure du gène et de son expression dans la graine en réponse à différents facteurs abiotiques. De plus, les effets de l'annihilation du gène sur la graine par ARN interférentiel (RNAi) ont été mis en évidence. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis.

II. Article en soumission pour une publication dans « Plant Molecular Biology ».

**MtSAP1, a Stress-Associated Protein Containing A20/AN1 Zing-Finger Domains, is involved in Seed germination in the Model Legume *Medicago truncatula***

**Marie-Laure Gervais, Christine Gimeno-Gilles\*, Elisabeth Planchet, Anis Limami and Eric Lelievre.**

University of Angers

UMR PMS 1191 Seed Molecular Physiology

2 Bd Lavoisier

49045 ANGERS cedex - France

**Footnotes:** \*The first two authors contributed equally to this work

## **Abstract**

*MtSAP1* (*Medicago truncatula* Stress Associated Protein 1) was revealed as a down-regulated gene by a suppressive subtractive hybridization between two mRNA populations of embryo axes harvested before and after radicle emergence. *MtSAP1* is the first gene encoding a SAP with A20 and AN1 zinc-finger domains characterized in *Medicago truncatula*. *MtSAP1* protein shares 62% and 54% homology with *OsiSAP8* (*Oryza sativa*) and *AtSAP7* (*Arabidopsis thaliana*) respectively, with in particular a strong homology in the A20 and AN1 conserved domains. *MtSAP1* expression increased during the acquisition of tolerance to desiccation, reached its maximum in the dry seed and decreased dramatically during the first hours of imbibition. Abiotic stresses (cold and hypoxia), abscisic acid or desiccation treatments induced also the *MtSAP1* expression and protein accumulation in embryo axis, while mild drought stress did not affect significantly its expression. This profile of expression along with the presence of anaerobic response elements and ABRE sequences in the up-stream region of the gene is consistent with a role of *MtSAP1* in the tolerance of low oxygen availability during late stages of seed maturation and desiccation. Silencing of *MtSAP1* using a RNA interference (RNAi) approach resulted in a phenotype with reduced seed size and germination percentage compared with the wild-type seeds.

**Keywords** : A20/AN1 zinc-finger domain protein, abiotic stress, desiccation, seed germination, *Medicago truncatula*.

## **Introduction**

Seed maturation is an important phase of seed development. According to several plant models, this process can be divided into two stages, morphogenesis and maturation. Seed maturation begins when developing embryos cease their cell division, and start growing by cell enlargement and accumulating storage reserves. Maturation ends with a desiccation phase after which the embryo enters into a quiescent state, thereby permitting its maintenance and survival under a range of environmental conditions. In maturing seeds, the embryo is challenged by two adverse conditions that are the low oxygen availability and the desiccation of the tissues. Several genes regulated by the phytohormone abscisic acid (ABA) are induced in the embryo, besides to those required for the synthesis of storage reserves they include those involved in the acquisition of desiccation tolerance. Actually, in most vegetative tissues, ABA mediates several aspects of physiological responses to environmental challenges such as drought, salt, hypoxia, cold stress and pathogen attacks (Gutierrez et al. 2007).

Anaerobically induced genes are often characterized by the presence of anaerobic response elements in their promoter regions. The tolerance to low oxygen availability in plants includes the induction of the so called 'anaerobic' polypeptides (Sachs et al. 1996)., which the best characterized are enzymes involved in metabolic pathways related to oxidative catabolism of sugars (glycolysis, ethanol and lactic fermentation) and carbon skeleton storage as amino acids (alanine fermentation).

Stress Associated Protein (SAP) gene families were characterized by the presence of A20/AN1 domain in their putative encoded protein. The A20 zinc-finger (ZnF) domain was first identified in a TNF- $\alpha$  inducible protein in human cells and is characterized by multiple Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub> finger motifs. Human A20 protein is an inhibitor of cell death

that polyubiquitinylates the mediator protein RIP, targeting for its degradation, and that inhibits NF- $\kappa$ B activation [213]. The AN1 domain was first identified in the C-terminus of the ubiquitin-like protein coded by the *Xenopus Laevis* animal hemisphere 1 (AN1) maternal RNA [214]. This domain is a zinc finger-type domain and is usually found associated with the A20 zinc-finger domain. The AN1-type zinc finger contains six conserved cysteines and two histidines that could potentially coordinate two zinc atoms [214]. The role of the A20/AN1 proteins has been well studied in animal immune systems (Huang et al. 2004, Diatchenko et al. 2005). In plants, very few information is known about A20/AN1 proteins. Recently, Vij and Tyagi (2008), when screening public databases, have conducted a survey A20/AN1 zinc-finger protein across diverse organisms with a special emphasis on plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor* and *Vitis vinifera*). All the species contain between one to nineteen A20/AN1 proteins. From *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* genomes, respectively 18 and 14 genes code for SAP, and most of them encode proteins with A20/AN1 domains. A member of SAP gene family from rice OsiSAP1 (*Oryza sativa* Stress-Associated Protein 1) was the first plant protein identified as a zinc-finger protein and has been shown to be induced in rice seedlings in response to environmental challenges and abscisic acid (ABA) treatment, and to confer abiotic stress tolerance to transgenic tobacco over-expressing the gene [200]. Recently, the over-expression of OsiSAP8 has been shown to confer tolerance to salt, drought and cold stress (Kanneganti and Gupta 2008). These authors demonstrated that A20 and AN1 type zinc-finger domain from this protein interact with each other but only A20 interacts with itself in a yeast two-hybrid system. According to them, an OsiSAP8 gene product might act in the early

phase of signal transduction pathway with a stress response. The mechanism by which stress tolerance is conferred is still unknown.

Our strategy for improving knowledge of important and vital events of germination was based on a suppressive subtractive hybridization (SSH) transcriptomic analysis of embryo axis for the identification of genes involved in germination completion. The subtraction was carried out between two mRNA populations extracted at two imbibition stages, 6 hours that is the end of the phase of passive and massive uptake of water, and 23 hours that is 2 hours after germination completion characterized by radicle protrusion. In our previous studies (see Bouton et al. 2005, Gimeno-Gilles et al. 2009), the attention was focused on up-regulated genes with the attempt to unravel their involvement in the control and the completion of germination process. In this present work, a down-regulated gene that belongs to the family of genes encoding SAP has been chosen, and to our knowledge this is the first study dedicated to a SAP protein in seeds. The aim of this work was to contribute to unravel the role of *MtSAP1* during the seed maturation and germination, but also under abiotic stresses. By using, notably, RNA interference (RNAi)-mediated silencing of *MtSAP1* in *M. truncatula*, we hypothesized that *MtSAP1* protein might play a role in the maturation of *M. truncatula* seeds in relation with a stress caused by events which are specific to this stage of development, either the desiccation or the low oxygen environment.

## **Results**

### **Cloning of *Mt SAP1* and *in silico* analysis**

A SSH library was constructed from embryo axis between two early steps of *Medicago truncatula* seed germination (6 and 23 hours after imbibition). Sequencing was performed on 900 clones, and sequence analysis and comparison revealed 355 unique ESTs. Among them, 68 ESTs were down-regulated between 6 and 23 hours, with in particular MtSAP1 (TC95263) which the full-length sequence has already been cloned (Gimeno-Gilles et al. 2009). The genomic sequence of MtSAP1 (UniProtKB/TrEMBL entry A2Q3D5) is located on chromosome 7. The coding sequence of MtSAP1 (Fig. 1a) is intronless but there are two introns of 1137 bp and 92 bp in the 5'UTR region.

The protein sequence is constituted of 172 amino acids with a predicted molecular mass of 18.8 Kda and contains two ZnF domains, A20 and AN1 (Fig. 1b). These domains are found alone or together in eight other putative proteins of *Medicago truncatula*. Sequence alignment is shown in Figure 2a. A20 and AN1 domains are found together in numerous other proteins in plants and mammals such as human ZnF216 and AWP1 proteins, sharing 46% and 47% homology with MtSAP1 respectively, and showing identities in the ZnF domains (Fig. 2b). The MtSAP1 protein sequence shares 62% homology with rice OsiSAP8 and 54% homology with AtSAP7, and presents a strong homology in the domain sequences with these proteins (Fig. 2c). It also shares homology with virtually translated ESTs of the *Lotus japonicus* (TC14575, 87%) and soya bean (TC205260, 75%), with identical ZnF domains (Fig. 2c). The upstream region (2.5 Kb) of the MtSAP1 gene was used to search the database for regulatory motif using PLACE database. Anaerobic-responsive elements and ABRE involved in abiotic stress responsive gene

expression were identified (Fig. 1c), indicating their association with stress inducible expression of MtSAP1.

### ***MtSAP1* gene expression in embryo axis during maturation, germination and post-germination of *Medicago truncatula***

The expression of *MtSAP1* in embryo axis was investigated by real RT-PCR during seed development, germination and post-germination growth (Fig. 3). During seed development, gene transcription exhibited a low level during the first 20 days after pollination (DAP). A strong increase in *MtSAP1* expression was observed after 28 and 35 DAP that rised to  $4 \cdot 10^6$  copy numbers when desiccation was complete in the dry seed. Five hours after imbibition, amounts of mRNA decreased to  $2 \cdot 10^6$  copies and picked up a low background expression after 25 hours and remained constant even after 96h. These data show that *MtSAP1* expression kinetics is correlated with progressive tissue dehydration occurring in the last 10 days of seed development.

### **Analysis of RNAi MtSAP1 lines**

To investigate the role of MtSAP1 in seed of *M. truncatula*, plants were constructed using RNAi technology to disrupt the *MtSAP1* gene. From seven transgenic lines selected by PCR, one line was further analysed by immunoblotting with antibodies anti-MtSAP1 on the mature dry seeds. These antibodies were raised against a specific peptide which is highly specific for SAP1 and reduces the probability to cross match with another members of SAP in *M. Truncatula*.

The MtSAP1 protein was highly abundant in the mature wild type (WT) seeds and undetectable in the mature seeds of the transgenic line (Fig. 4a). The disruption of the expression of *MtSAP1* resulted in a severe seed phenotype. The transgenic

seeds were smaller in terms of size and weight compared to WT seeds (Fig. 4b, c). The analysis of the seed protein content showed that the accumulation of Vicilin and Legumin in RNAi seeds were reduced (in comparison to the WT seeds), while the total amount of proteins of RNAi seeds was not affected (Fig. 4d).

### **Seed germination of RNAi MtSAP1 lines**

To investigate the possible involvements of the MtSAP1 on germination, a test run on seeds from WT and two RNAi lines was carried out. The disruption of the expression of *MtSAP1* severely affected the germination capacity of the transgenic lines. The percentage of germinated seeds in WT was 78% after 48h of imbibition, while it hardly reached 12% in the RNAi seeds during the same period of imbibition (Fig. 5).

### **Induction of *MtSAP1* expression by ABA during seed imbibition**

In order to test *MtSAP1* hormone responsiveness, seeds were imbibed with ABA (100  $\mu$ M), gibberellic acid (GA; 100  $\mu$ M) and ethylene precursor 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic acid (ACC; 100  $\mu$ M). GA and ACC promote germination. After 50 hours of imbibition, in comparison with the water condition, *Medicago truncatula* germination rates and radicle length were greater in GA and ACC treatments (data not shown). On the contrary, germination was inhibited in presence of ABA: the rate was reduced by half and radicles failed to elongate more than 2 mm (data not shown). The results in figure 6A show that *MtSAP1* expression during germination was strongly over-expressed in 100  $\mu$ M ABA conditions - approximately 6/8 fold higher in comparison with water. GA nor ACC failed to stimulated *MtSAP1* expression during germination (data no shown).

The ABA dose sensitivity of *MtSAP1* was checked out by applying various concentrations (5  $\mu$ M to 100  $\mu$ M) of the hormone in the germination medium. *MtSAP1* gene expression was strongly induced at one and the same time by low ABA-concentration, but also by high concentration of ABA, showing that the induction of *MtSAP1* gene expression was dependent on the presence of ABA but in a dose-independent way (data not shown).

Similarly the accumulation of MtSAP1 protein was induced by ABA in WT radicles, while the same treatment failed to induce the accumulation of the protein in the radicles of the transgenic line (Fig. 6B)

### ***MtSAP1* gene expression highly induced by desiccation**

Gene expression stimulation in the late embryo development could be a response to abiotic stress caused by desiccation. To test this hypothesis, desiccation was induced after 15 hours of water seed imbibition with high concentration of polyethylene glycol (PEG, -3 MPa). This specific treatment has already been shown to induce stress in tissues (Buitink et al. 2006). In comparison with the control, *MtSAP1* is over-expressed approximately six fold higher in desiccation conditions, reaching  $3 \cdot 10^6$  copy numbers (Fig. 7). These data seems to confirm the involvement of *MtSAP1* in the acquisition of desiccation tolerance at the end of seed maturation.

### **Involvement of *MtSAP1* in abiotic stress responses**

In order to test *MtSAP1* abiotic stress-responsiveness and validate *in silico* analysis of the upstream region, seedlings were submitted to various stress conditions: osmotic stress (NaCl, 200 mM), drought stress mimicked by mild PEG treatment (-0.25 MPa), cold (4°C) and hypoxia (Ricoult et al. 2005, 2006). Water condition was

used as a control. All these treated embryo axes were unequivocal stressed. Indeed, proline and alanine accumulation, commonly used as indicators of mild drought stress and hypoxia respectively, has been observed in these stressed tissues (data not shown; Limami et al. 2008).

Expression analysis showed that *MtSAP1* gene was not sensitive to drought stress while a drastic osmotic stress (NaCl, 200 mM) induced a two fold increase of the gene expression, similarly to the cold condition (Fig. 8). The only abiotic stress that showed a very significant effect on the gene expression was hypoxia, under which *MtSAP1* level of expression was 5 fold higher than in the control (Fig. 8).

The amount of SAP1 proteins was monitored by immuno-blotting after protein separation by SDS-PAGE in embryo axis. In agreement with gene expression data, the amount of SAP1 protein was largely induced by cold, hypoxia and desiccation treatments in comparison to water condition, whereas drought stress (PEG, -0.25 MPa) failed to induce accumulation of *MtSAP1* protein (Fig. 8). It is worth noting that ABA treatment (at a low concentration, 10  $\mu$ M) induced in a very strong way *MtSAP1* protein amount. Unexpectedly, *MtSAP1* protein was not accumulated under saline conditions.

## **Discussion**

Unlike the A20/AN1 zinc-finger proteins in humans and other model animal systems, very little information is available on such proteins in plants. In animal systems, these proteins play an important role in regulating the immune response, inflammatory responses and anti-apoptosis (Huang et al. 2004, Wertz et al. 2004).

In the present work, a transcriptomic approach on the model legume *Medicago truncatula* allowed us to isolate the first gene coding for an A20/AN1 zinc-finger stress associated protein expressed in an embryo during its maturation phase, namely *MtSAP1*. This gene is strongly induced at the end of seed maturation during the acquisition of tolerance to desiccation with its maximum of expression in the dry seed. Most of zinc finger domain proteins act as transcriptional factors, however *in silico* analysis of *MtSAP1* gene product did not predict any potential nuclear localization signal. *MtSAP1* might not be a transcription factor alternatively with its zinc-finger domain; it may be involved in protein-protein interaction.

### **Characterization of *MtSAP1* and putative role in *Medicago Truncatula***

In order to learn more about the role of *MtSAP1* in the maturing embryo, we put forward the hypotheses that the expression of the gene might be regulated by ABA and that the protein might play a role in relation to the tolerance of either desiccation or low oxygen stress (two adverse conditions encountered in the maturing seed). These hypotheses were based on i) the expression profiling during maturation, ii) the presence of ABRE and 'anaerobic response' elements in the promoter sequence of *MtSAP1* and iii) the literature in which recent works on rice and Arabidopsis showed the involvement of members of the family of the A20/AN1 zinc finger proteins in abiotic stresses (Vij and Tyagi 2006). *OsiSAP1* and *OsiSAP8* have been shown to be

induced in rice seedlings in response to various abiotic stresses and ABA treatment, and to confer tolerance to salt, drought and cold stress to transgenic tobacco over-expressing the gene (Mukhopadhyay et al. 2004, Kanneganti et al. 2008). Several evidences are in favor of our hypotheses. The induction of the *MtSAP1* expression and the protein accumulation by ABA treatment of germinating embryo axis showed that *MtSAP1* is up-regulated by ABA.

The involvement of *MtSAP1* in the tolerance of the embryo to desiccation is supported by the induction of the expression of *MtSAP1* accompanied by the accumulation of the protein in germinating embryo axis submitted to desiccation treatment (PEG, -3 MPa). The regulation of *MtSAP1* by desiccation seemed specific to this situation of extreme dehydration of the tissues because neither the messengers nor the protein accumulated in germinating embryo axis submitted to drought stress (PEG, -0.25 MPa). It is worth to note that although *MtSAP1* is responsive to ABA and shares more than 50 % homology with genes encoding SAP with A20/AN1 domains expressed in Arabidopsis and rice, it is not sensitive to drought stress. This difference suggests that the *SAP* isogene expressed in embryos and embryo axes of *Medicago truncatula* is not regulated by the same signaling mechanisms as the isogenes expressed in Arabidopsis and rice vegetative tissues. The involvement of *MtSAP1* in the tolerance of low oxygen availability in seeds during late stages of maturation is supported by the induction of the expression of *MtSAP1* accompanied by the accumulation of the protein in germinating embryo axis submitted to submergence treatment. Gas exchanges are considerably reduced in seeds because of their cutinized cell layers and low stomatal frequency on pods. Concomitantly with seed desiccation, tissues lose their green color and

photosynthetic activity, leading to very low oxygen content in the dry seeds (Rolletschek et al. 2002).

The regulation of *MtSAP1* by two other abiotic stresses, osmotic stress and cold, was checked out in germinating embryo axes. Genes encoding SAP proteins were shown to be responsive to cold and osmotic stress in *Arabidopsis* and rice (Mukhopadhyay et al. 2004, Ströher et al. 2009). Similarly *MtSAP1* was found to be responsive to cold treatment. The expression of the gene as well as the accumulation of the protein was boosted in embryo axes submitted to low temperature (4°C). The responsiveness to osmotic stress was not obvious: a treatment of the embryo axes by a very high concentration of NaCl (200 mM) was needed for the induction of the gene expression that was not accompanied by the protein accumulation.

### **RNAi of *MtSAP1* leads to reduce seed quality and germination**

By using an RNAi *MtSAP1* lines, the implication of SAP1 in seed quality was demonstrated. The absence of SAP1 protein leads to a very severe seed phenotype, with in particular a reduction of the size and weight of the transgenic knockdown seeds. These results indicate that *MtSAP1* is involved in the regulation of seed maturation, and especially during the filling of storage protein (Vicilin and Legumin). The absence of these proteins and SAP1 protein leads to altered germination.

In conclusion, a gene encoding a protein of the ‘Stress Associated Proteins’ family was isolated in *M. truncatula* embryos. The synthesis of the protein *MtSAP1* is regulated by ABA and this protein is very likely involved in the process of the tolerance of the maturing embryo to either desiccation, hypoxia or cold stress. The

question that needs to be addressed now is what is the physiological relevance of the responsiveness of *MtSAP1* to a such a variety of abiotic stresses.

## **Materials and Methods**

### *Plant material and experimental treatments*

Seeds of *Medicago truncatula* cv Parragio were germinated in 9 cm diameter Petri dishes on Whatman paper soaked with 3.5 mL solution with ultra-pure water (control) or with different hormonal solutions : gibberellic acid (GA; 100  $\mu$ M), 1-aminocyclopropan carboxylic acid (ACC; 100  $\mu$ M) to mimic ethylen treatment and abscisic acid (ABA; 10 - 100  $\mu$ M) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

For abiotic stresses, seeds were germinated for 48 h on water. Afterwards, seedlings were subjected to various treatments: saline stress (NaCl, 200 mM), drought stress mimicked by mild polyethylene glycol treatment (PEG 6000, -0.25 MPa), dehydration stress (PEG was adjusted to concentration for an osmotic pressure of -3 MPa), and water (control). For hypoxia condition, seeds were immersed with ultra-pure water in hermetically closed polypropylene flask. All experiments were made in darkness and maintained at 20°C, except for cold stress where embryo axis were placed at 4°C. After various imbibition times, embryo axis were collected and immediately frozen in liquid nitrogen.

### *Cloning of MtSAP1*

Reverse library of suppressive and subtractive hybridization between 6 and 23 hours after *Medicago truncatula* cv Parragio seed imbibitions, revealed full-length *MtSAP1* cDNA. The library was constructed using a Clontech PCR-select cDNA subtraction Kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Finally, *MtSAP1* was cloned in pGEMT vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA) flanked by a sequence of nested primers, and propagated in a TOP10 *E. coli* strain (Invitrogen, Breda, The Netherlands).

### *in Silico analysis*

*MtSAP1* cDNA sequence and *Medicago truncatula* homologues were found using TGIP BLAST software available online (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>) and browsing genomic data from Information System revealed genomic sequences and chromosome locations. Cis-acting elements in the upstream region were discovered using the PLACE database [215]. A deduced protein structure was compared to known proteins with BLAST tool from the ExPASy website.

### *RNA isolation and reverse transcription*

For total RNA isolation, frozen embryos were crushed with a mortar and pestle. The powder was treated with a TriReagent® (Ambion, Austin, TX, USA) following the manufacturer's instructions. cDNAs were obtained by retrotranscription of 2 µg of total RNA using 200 units of RT-MMLV (Invitrogen, Breda, The Netherlands), 2 µg of random primer (Invitrogen) in the presence of 40 units of a Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA). Reaction occurred for one hour at 37°C in total volume of 50 µL.

### *Real-time quantitative PCR*

Reactions took place on the light cycler ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Each reaction was performed with a 3 µL of a 1:2 (v/v) dilution of the first cDNA strands using a SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions, with 200 nM of each primer in a total reaction of 25 µL. The reaction was incubated for 2 min at 50°C and 10 min at

95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 58°C. The specificity of the PCR amplification procedure was checked with a heat-dissociation protocol (from 65°C to 95°C) after the final cycle of PCR. Each measure was carried out with at least two biological repeats using a duplicated PCR reaction for determining Ct values. mRNA amounts were calculated in copy number, referring to a standard curve made from MtSAP1 qPCR amplicon cloned in plasmid vector.

#### *MtSAP1 protein analysis by immunoblotting*

To raise a specific antibody directed against *Medicago truncatula* SAP1 protein, the specific peptide VSPEVPENPISNEESC was used to immunize rabbits. Antibodies were affinity-purified (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Soluble proteins were extracted from frozen material in Tris-HCl buffer (25 mM, pH 7.6) with 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (aprotinin 5µg/ml, leupeptin 2µg/ml, pepstatin 0,1µg/ml, PMSF 1µM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 5mM). After denaturation, equal amounts of protein (30 µg) were separated on an SDS-polyacrylamide gel (14% (v/w) polyacrylamide). Proteins were then transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After incubation with a rabbit polyclonal anti-SAP1 antibody (1/2000), proteins were detected using a goat peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1/4000) (Sigma) and visualized using ECL chemiluminescence (Biorad Hercules, CA, USA).

#### *Storage proteins analysis*

Ten mature seeds from either wild-type or transgenic plants were harvested and grinded in liquid nitrogen with a tissue-lyser (Qiagen). Resulting powder was then dissolved in 500 µl extraction buffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA and 1 mM PMSF)

and the lysate was stirred for 30min and centrifuged for 15 min at 13000g at 4°C. Subsequently, the pellet was resuspended with extraction buffer supplemented with 0.2 M NaCl to extract vicilin fraction. After 15min centrifugation at 13000g at 4°C, supernatant was removed and pellet was resuspended a last time with extraction buffer supplemented with 1 M NaCl to extract legumin fraction. Protein concentration was determined using Bradford assay.

#### *Plasmid construction and transformation procedure*

To construct the *MtSAP1* RNAi plasmid a specific region 600-pb portion of *MtSAP1* was amplified. The product of the amplification was transferred by recombination using the Gateway Cloning Technology (Invitrogen) into the binary vector pFCGC5941. This plasmid contains sense and antisense Gateway cassette, separated by a *chalcone synthase A* intron and driven by a 35S promoter. Transformation of the plasmid into R108 and in vivo culture was performed according to Trinh et al. using *A. Tumefaciens* strain EHA105. Selection of positive transgenic lines was performed by PCR.

#### **Funding** :

This work was funded by grants from the EU FP6 project FOOD-CT-2004-506223, 'Grain Legumes Integrated Project (GLIP)' and COSAVE Contract with Région Pays de la Loire, France.

## References

Bouton, S., Viau, L., Lelièvre, E. and Limami, A.M. (2005) A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *J. Exp. Bot.* 56: 825-832.

Buitink, J., Leger, J.J., Guisle, I., Vu, B.L., Wuillème, S., Lamirault, G. et al. (2006) Transcriptome profiling uncovers metabolic and regulatory processes occurring during the transition from desiccation-sensitive to desiccation-tolerant stages in *Medicago truncatula* seeds. *Plant J.* 47: 735-750.

Diatchenko, L., Romanov, S., Malinina, I., Clarke, J., Tchivilev, I., Li, X. and Makarov, S.S. (2005) Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *J. Leukoc. Biol.* 78: 1366-1377.

Eckardt, N. A. (2002) Alternative splicing and the control of flowering time. *Plant Cell* 14: 743-746.

Gimeno-Gilles, C., Lelièvre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A. et al. (2009) ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Mol. Plant* 2: 108-119.

Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M. and Bellini, C. (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* 12: 294-300.

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27: 297-300.

Huang, J., Huang, J., Teng, L., Li, L., Liu, T., Li, L. et al. (2004) ZNF216 Is an A20-like and IkappaB kinase gamma-interacting inhibitor of NFkappaB activation. *J. Biol. Chem.* 279: 16847-16853.

Kanneganti, V. and Gupta, A.K. (2008) Overexpression of OsiSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Mol. Biol.* 66: 445-462.

Limami, A.M., Glevarec, G., Ricoult, C., Cliquet, J.B. and Planchet, E. (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *J. Exp. Bot.* 59: 2325-2335.

Linnen, J.M., Bailey, C.P. and Weeks, D.L. (1993) Two related localized mRNAs from *Xenopus laevis* encode ubiquitin-like fusion proteins. *Gene* 128: 181-188.

McCourt, P. (1999) Genetic analysis of hormone signalling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 20: 219-243.

Mukhopadhyay, A., Vij, S. and Tyagi, A.K. (2004) Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6309-6314.

Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and Grasses. *Plant Physiol.*149: 88-95.

Ricoult, C., Cliquet, J.B. and Limami, A.M. (2005) Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance. *Physiol. Plant.* 123: 30-39.

Ricoult, C., Orcaray Echeverria, L., Cliquet, J.B. and Limami, A.M. (2006) Characterization of alanine aminotransferase (*AlaAT*) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 57: 3079-3089.

Rolletschek, H., Borisjuk, L., Koschorreck, M., Wobus, U. and Weber, H. (2002) Legume embryos develop in a hypoxic environment. *J. Exp. Bot.* 53: 1099-1107.

Sachs, M.M, Subbaiah, C.C. and Saab, I.N. (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Bot.* 47: 1-15.

Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.

Ströher, E., Wang, X.J., Roloff, N., Klein, P., Husemann, A. and Dietz, K.J. (2009) Redox-dependent regulation of the stress-induced zinc-finger protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2: 357-367.

Vij, S. and Tyagi, A.K. (2006) Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genomics* 276: 565-575.

Vij, S. and Tyagi, A.K. (2008) A20/AN1 zinc-finger domain-containing proteins in plants and animals represent common elements in stress response. *Funct. Integr. Genomics* 8: 301-307.

Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S. et al. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430: 694-699.

## **Figure legends**

**Figure 1:** Coding sequence (a) and deduced protein sequence (b) of *MtSAP1*. Shadowed amino acids represent zinc-finger A20 and AN1 domains. Amino acids implicated in the interaction with zinc atoms are represented in black boxes. Upstream region of the *MtSAP1* gene exhibited anaerobic response element sequences and ABRE-related sequences (c).

**Figure 2:** Protein sequence alignments of *MtSAP1* with the eight another *Medicago truncatula* proteins containing A20 and/or AN1 zinc-finger domains (a), with human A20/AN1 proteins AWP1 and ZNF216 (b), and with A20/AN1 proteins from various plant species (c). Shadowed amino acids represent zinc-finger A20 and AN1 domains. Amino acids implicated in the interaction with zinc atoms are represented in red boxes. VIRT\_106320: deduced amino acid sequence of *Medicago truncatula* TC106320; VIRT\_GmTC205260: deduced amino acid sequence of *Glycine max* TC205260; VIRT\_LjTC14575: deduced amino acid sequence of *Lotus japonicus* TC14575.

**Figure 3:** Expression profile of *MtSAP1* in seeds and in embryo axis during maturation and germination. *MtSAP1* expression was determined by quantitative real time RT-PCR. Each measure was carried out with at least two biological repeats using a duplicated PCR reaction for determining Ct values. Data are means  $\pm$  SD of three replicates.

Figure 4: Characterization of RNAi MtSAP1 lines.

(a) Western blot on protein extracts from mature seeds of WT and RNAi MtSAP1 lines. (b) Comparison of seed size in WT and RNAi lines. (c) Seed weight of transgenic (stripped) and wild type (black) lines (mg/seed). (d) Effect of RNAi-mediated silencing of MtSAP1 on protein content in mature seeds. Total amount of proteins, Vicilin and Legumin (mg protein per g DW) was measured in mature seeds of WT and transgenic RNAi MtSAP1 lines. Data are means  $\pm$  SD of three replicates, each one containing ten seeds.

Figure 5: Effect of absence of MtSAP1 protein on *Medicago truncatula* seed Germination. Germination rate is the mean of 50 seeds germinated on water.

Figure 6: MtSAP1 production in embryo axes is sensitive to ABA treatment.

(a) The *MtSAP1* gene expression was represented as a ratio, comparing 10  $\mu$ M ABA treatment versus control condition (water) at different time points. Data are means  $\pm$  SD of three replicates. (b) MtSAP1 protein expression in WT and RNAi lines under ABA treatment. MtSAP1 immunoblot was realised on protein extract from embryo axes imbibed for 48 h in water or on ABA (10  $\mu$ M). Expression under water condition in WT line was used as negative control.

Figure 7: Effect of a dehydration inducer (PEG) on *MtSAP1* expression in embryo axis. Transcript copy numbers are monitored in dry seed and at different times after imbibition. PEG (-3 MPa) was added after 15h of imbibition in order to re-induce desiccation. Data are means  $\pm$  SD of three replicates.

Figure 8: Effects of different abiotic stress conditions on *MtSAP1* expression in embryos axis. (a) Seedlings were grown under drought stress (PEG, -0.25 MPa), salt stress (NaCl, 200 mM), cold stress and hypoxia for 24h. *MtSAP1* gene expression was expressed in ratio in comparison with control (water). Data are means  $\pm$  SD of three replicates. (b) *MtSAP1* protein expression was determined in embryo axes of *Medicago Truncatula* seedlings by immunoblotting. For water and ABA treatment, seeds were germinated either on water or ABA (10  $\mu$ M) for 48h. For others treatments, seeds were incubated in water for 24h before being transferred to abiotic stress (salt, cold, dehydration, hypoxia and desiccation) for additional 24h. The data are representative examples out of two independent experiments.

## Figures

Figure 1

A - Coding sequence :

```

ATGGAGTCGCACGATGAGATGGGATGCCAGGCACCAGAACGTCCAATTCTGTG
CGTTAATAATTGTGGTTTCTTCGGAAGGGAAGCTACCATGAACATGTGTTCCAAG
TGTTACAAGGACACACTGCTGAAGCAGGAGCAGGAAAACTTGTTGCGACGTCA
GTTGAAAACATCGTGAATGGCAATTCCAGCAGCAATGGAAAGCTGGCTGTGACC
GCAAGTGCTGTTGATGCACGAGTTGAAAGTGTGGAGCTCAATACAGTGTCTCCC
GAGGTTCCAGAAAATCCAATCTCTAATGAGAGTGTGGAGATGAAAGCCAAGACT
GGTCCCAGCAGATGCGCTACTTGCCGGAACGTGTTGGATTAAGTGGTTTCAGC
TGCAAATGTGGCAACCTCTTTTGCTCAATGCATCGCTATTCTGATAAACACGATT
GCCCTTTTGATTATAGAAGTCTGGTCAGAAGGCCATAGCTGAATCCAACCCAG
TAATTAAGGCGGATAAACTCGATAAAATCTAG
  
```

B - Protein sequence :

```

                                A20 domain
MESHDEMGCQAPERPILCVNNCGFFGREATMNMCSKCYKDTLLKQEQEKLVATSV
ENIVNGNSSSNGKLAVTASAVDVRVESVELNTVSPEVPENPISNESVEMKAKTGPS
RCATCRKRVGLTGFSCKCGNLFCSMHRYSDKHDCPFDYRTAGQKAIAESNPVIKAD
                                AN1 domain
KLDKI
  
```

C







Figure 3 :

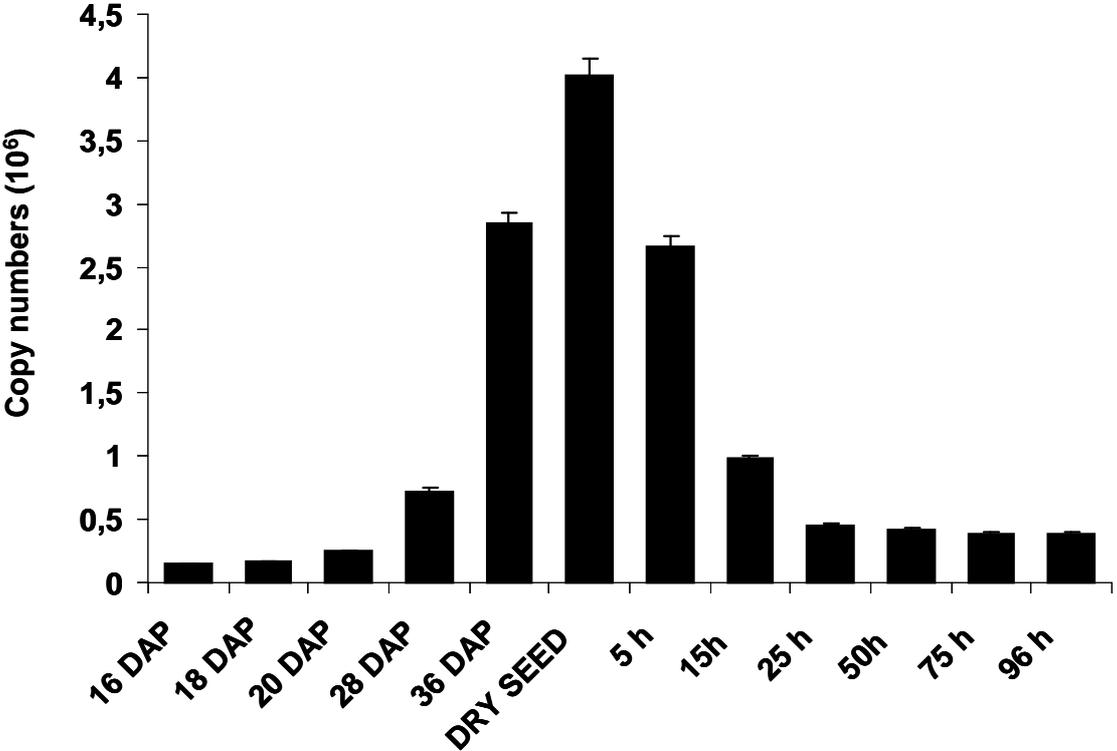


Figure 4 :

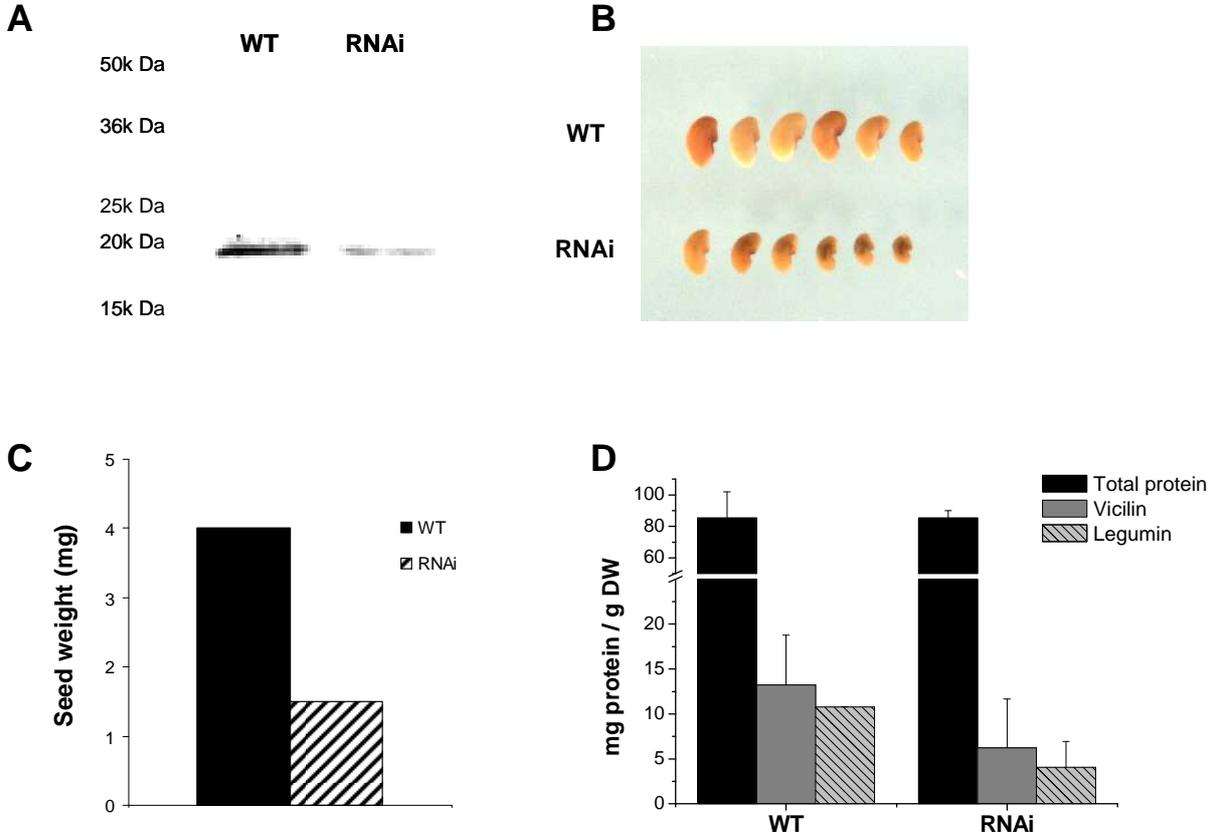


Figure 5 :

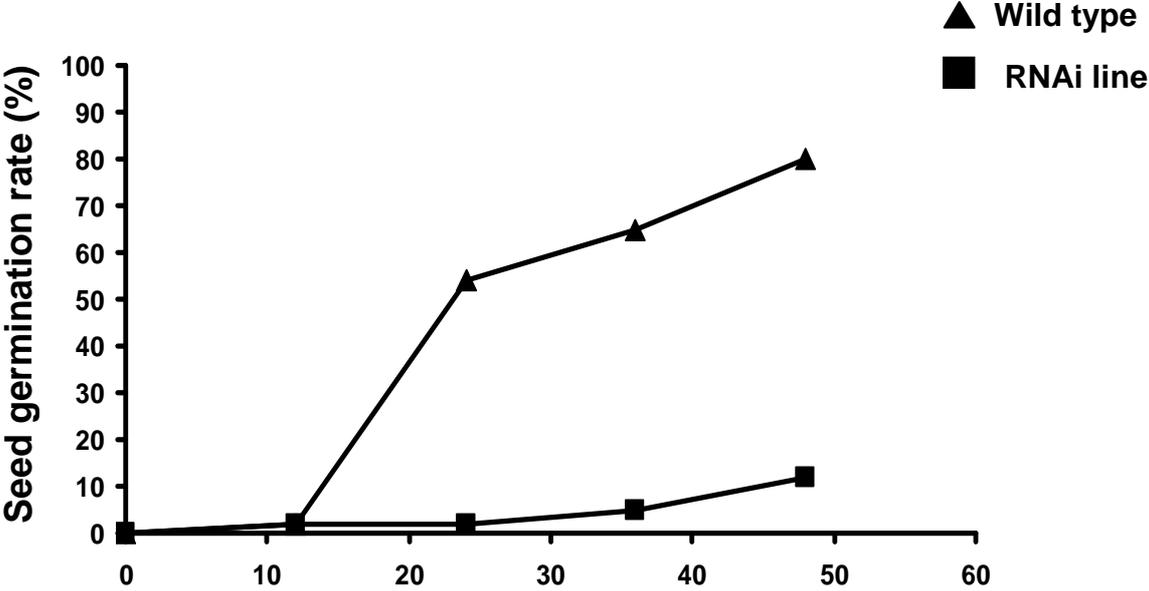


Figure 6 :

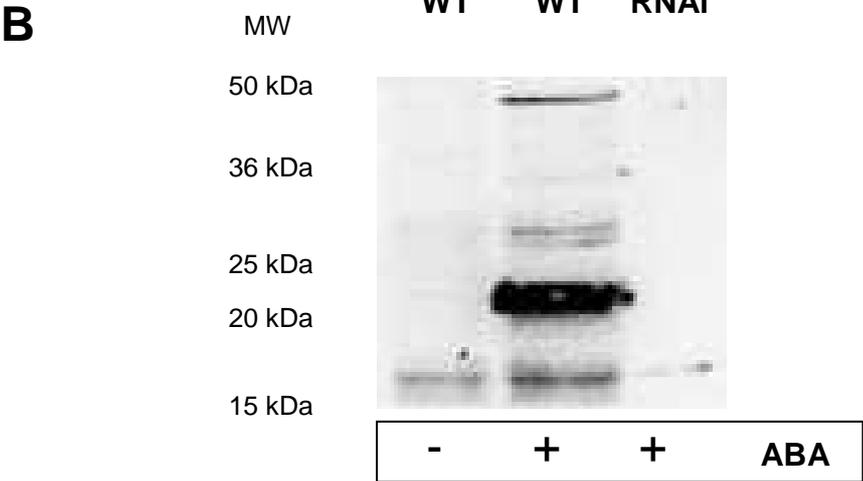
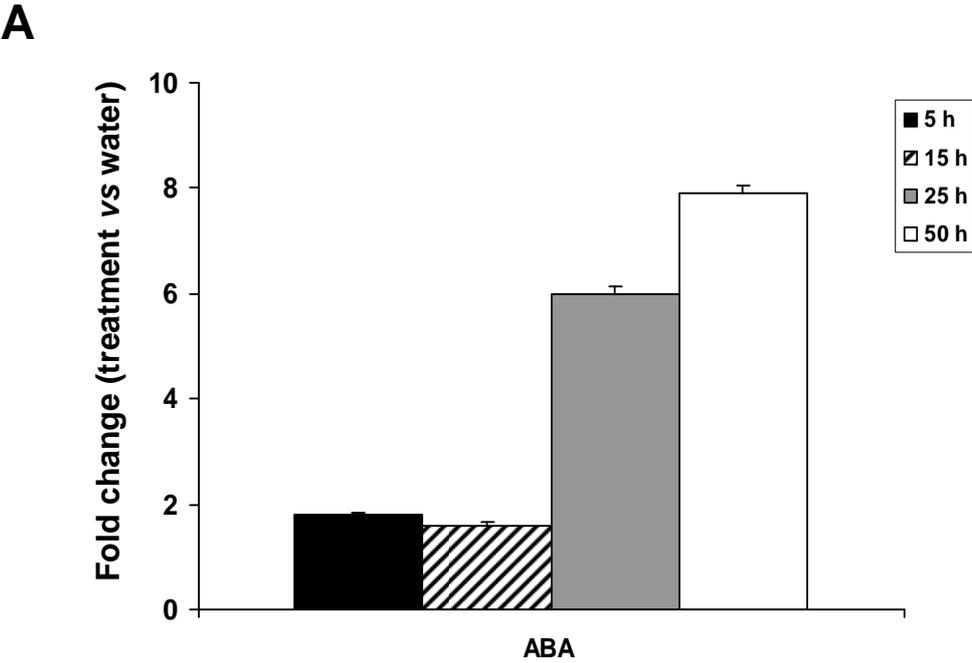


Figure 7 :

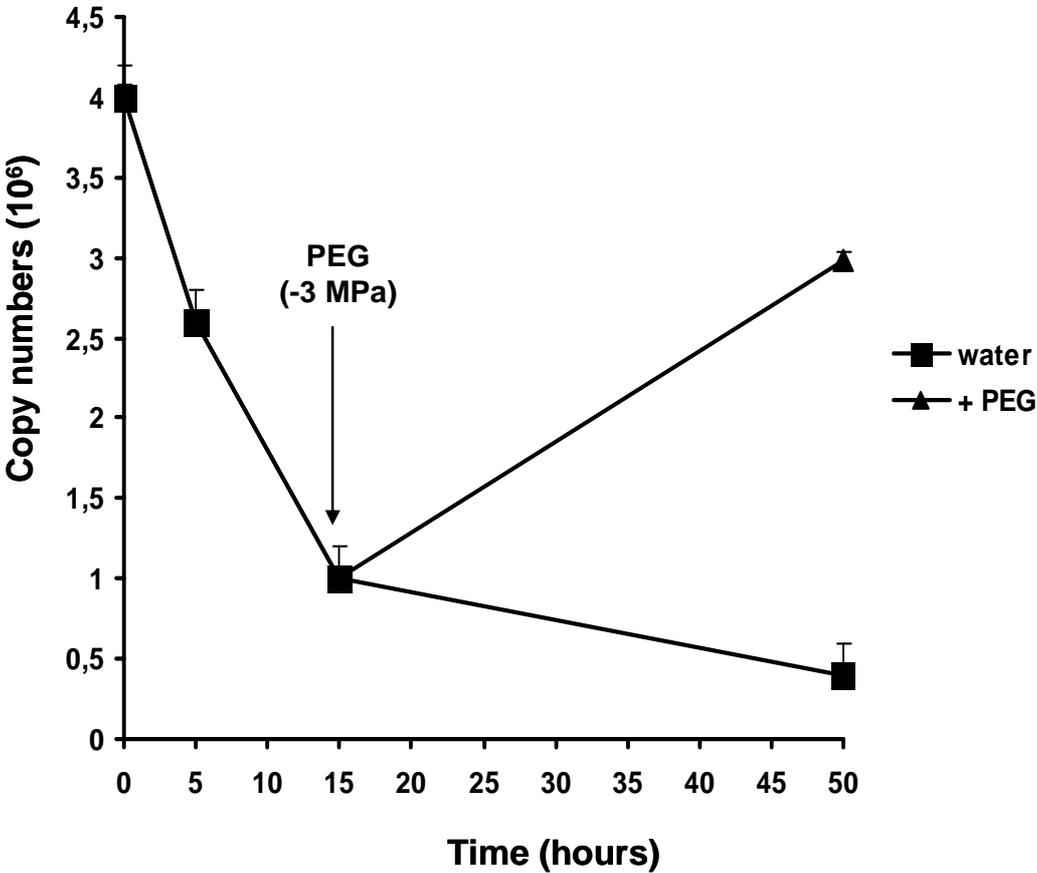
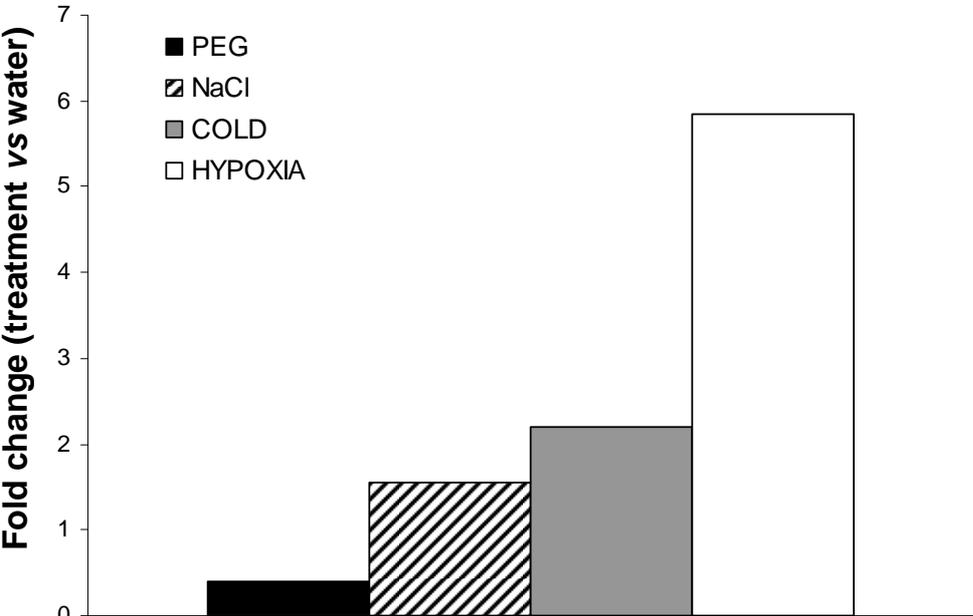
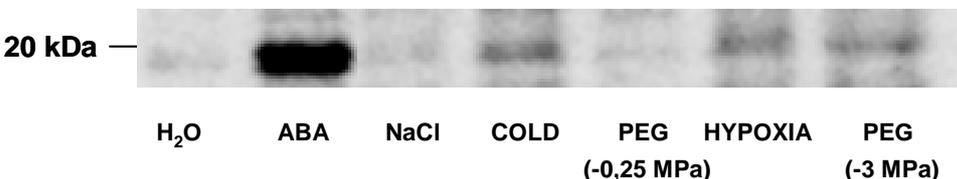


Figure 8:

**A**



**B**



### III. Conclusion.

Cette première partie présentait l'étude dans la graine de *MtSAP1*, gène nouveau chez *Medicago truncatula*.

Le gène *MtSAP1* a été isolé dans l'embryon et code une protéine de la famille des protéines en doigt de zinc de type SAP (« Stress-Associated Protein »). Elles sont caractérisées par la présence de domaine(s) A20 et/ou AN1 et ont été étudiées essentiellement chez les mammifères ; chez les plantes, les quelques informations proviennent du riz et d'*Arabidopsis thaliana*. *MtSAP1* est le premier gène *SAP* décrit chez *Medicago truncatula* dans l'embryon durant la maturation ; la protéine possède un domaine A20 en N-terminal et un domaine AN1 en C-terminal. Chez les végétaux, le mode d'action des protéines SAP est inconnu mais toutes les études suggèrent un rôle dans la réponse aux stress abiotiques.

Lors de cette étude, afin d'appréhender le rôle de *MtSAP1*, nous avons d'abord utilisé une approche *in silico* et transcriptomique pour analyser la sensibilité du gène à divers stress abiotiques que subit l'embryon mature. Par la suite nous avons étudié les effets de l'absence de *MtSAP1* dans la graine. *MtSAP1* présente une forte homologie avec l'orthologue du riz *OsiSAP1*. D'après l'étude *in silico*, *MtSAP1* serait un coactivateur impliqué dans des interactions protéiniques, bien que la majorité des protéines en doigt de zinc soient des facteurs de transcription. La région promotrice en 5' du gène présente des séquences spécifiques de modulation des réponses à l'ABA et à l'hypoxie. Les expériences effectuées confirment la régulation positive de *MtSAP1* par l'ABA et l'hypoxie au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Néanmoins, le traitement par l'ABA sur les plantes entières n'a pas eu d'effet sur l'expression du gène, suggérant peut-être la nécessité de signaux spécifiques à la graine.

Les graines dans lesquelles *MtSAP1* a été annihilé par RNAi présentent un phénotype particulier : les graines sont plus petites et ont une capacité germinative diminuée par rapport aux graines sauvages. De plus, l'accumulation de protéines de réserves varie dans les graines RNAi : les taux de vicillines et de légumines sont plus faibles.

Dans la graine, l'expression du gène augmente au début de la phase de dessiccation et atteint son maximum dans la graine sèche. En conditions physiologiques, la transcription est réprimée progressivement durant la germination. L'ABA, inhibiteur de la germination, stimule la transcription alors que les hormones pro-germinatives n'ont pas d'effet. La surexpression de *MtSAP1* est induite par l'ABA, dans des conditions hypoxiques, de basse température, et en cas de déshydratation de la graine préalablement imbibée.

L'ensemble des résultats suggèrent que MtSAP1 a un rôle dans les tissus embryonnaires durant la déshydratation et la survie à l'état sec, probablement *via* la résistance à l'hypoxie. Le rôle précis de *MtSAP1* demeure inconnu. La partie suivante présente l'étude des interactions de MtSAP1 *via* le double hybride bactérien.

## Partie 2 : Double hybride de MtSAP1.

### I. Introduction.

MtSAP1 est une petite protéine dont l'expression génique augmente durant la phase de dessiccation et diminue dès la germination. Au vu des variations de l'expression observées sous différents stimuli, MtSAP1 participerait à la survie de la graine à l'état sec ; cependant le rôle exact ainsi que les mécanismes mis en jeu sont indéterminés. Pour appréhender sa fonction, nous avons choisi de mettre en évidence ses partenaires d'interaction. Afin que la probabilité de la présence d'un maximum de partenaires soit la plus élevée, la banque d'ADNc a été réalisée à partir de la graine sèche, état où la transcription de *MtSAP1* est la plus élevée. Ce travail a été réalisé conjointement avec Christine Gimeno-Gilles.

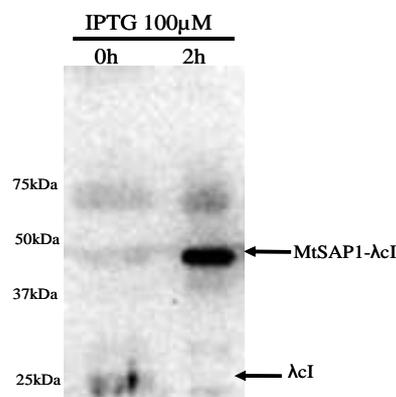
### II. Double hybride de MtSAP1.

#### 1. Faisabilité.

##### a. Production recombinante de la protéine appât MtSAP1.

Après production de la biomasse, la production recombinante a été induite avec 100 $\mu$ M d'IPTG pendant 2h à 37°C sous agitation à 225rpm et vérifiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine  $\lambda$ cI. La protéine recombinante MtSAP1- $\lambda$ cI a une masse moléculaire de 47kDa. La protéine est correctement produite par la bactérie ; la première condition nécessaire à la réalisation de double hybride bactérien est remplie.

Figure 25 : MtSAP1- $\lambda$ cI est produite par les bactéries du système double hybride.

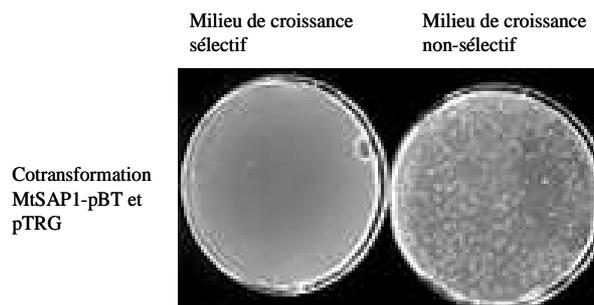


Western blot à l'aide d'un anticorps anti- $\lambda$ cI de la production recombinante de MtSAP1- $\lambda$ cI.

b. Test de « self activation ».

La deuxième condition *sine qua non* de la mise en place du double hybride bactérien est l'absence d'activation du gène rapporteur par la production recombinante de la protéine appât seule. Les bactéries sont cotransformées avec le plasmide recombinant de la protéine appât et le plasmide cible vide et étalées sur milieu sélectif et non sélectif. Après incubation, le pourcentage de clones obtenus sur milieu sélectif par rapport au nombre de clones obtenus sur milieu non sélectif est calculé. Aucun clone n'a crû sur milieu sélectif après production de MtSAP1 (cf. figure 26). Parallèlement, des milliers de clones ont crû sur milieu non sélectif. Il n'y a pas d'activation du gène rapporteur suite à la production recombinante de MtSAP1, le pourcentage de clones sur milieu sélectif par rapport aux clones sur milieu non sélectif étant inférieur à 0,1%.

Figure 26 : La production de la protéine appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.



2. Crible de la banque par la protéine appât MtSAP1.

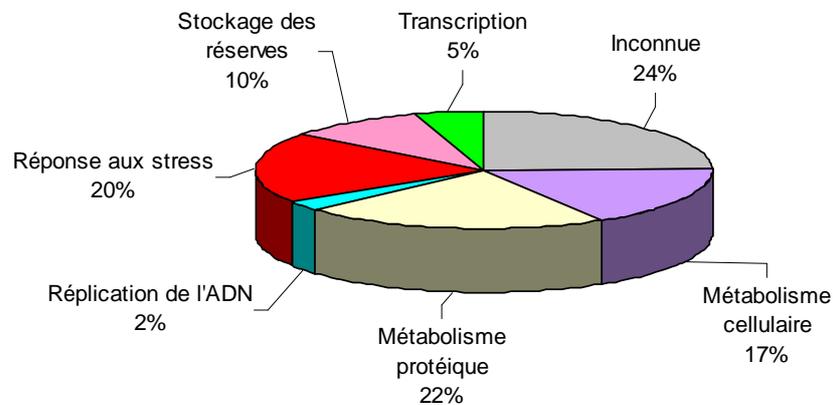
L'objectif du crible de la banque d'ADNc de graines sèches par la méthode du double-hybride bactérien était de rechercher les cibles d'interaction de la protéine MtSAP1. Le crible d'une partie de la banque d'ADNc par double hybride bactérien a permis d'obtenir 60 clones positifs. Après séquençage, 43 séquences uniques codent des protéines. Parmi ces dernières, 2 codent des protéines ribosomales et 2 sont redondantes.

Les clones obtenus ont été classés en fonction de leur nature fonctionnelle (cf. figure 27A). Il s'avère que 24% comportent des séquences codant des protéines dont les fonctions sont inconnues, et 39% codent des protéines liées à la production des protéines *in vivo* ou des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire. La majorité des protéines a une localisation cytoplasmique (30%), cependant la localisation subcellulaire est souvent

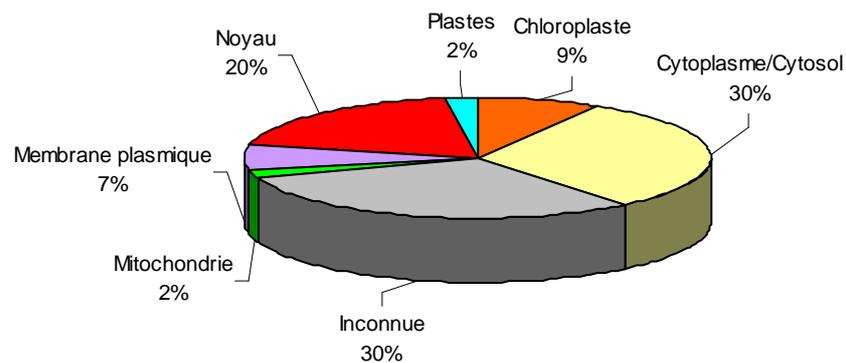
supposée et 30% de protéines n'ont pas de localisation définie (cf. figure 27B). Les clones obtenus comportent des séquences codant tout ou partie de protéine qui ne sont pas pour la plupart répertoriées dans la banque de données uniprot. De plus, certaines protéines sont déduites de la séquence génétique et leur nature est souvent déterminée par l'homologie de séquence avec d'autres séquences codantes. De ce fait, les protéines sont référencées sous le numéro TC de la banque de données spécifiques de *Medicago truncatula* et non sous le numéro d'accès uniprot.

**Figure 27 :** Répartition des partenaires potentiels de MtSAP1 obtenus.

*A. Répartition des partenaires en fonction de leur nature fonctionnelle.*

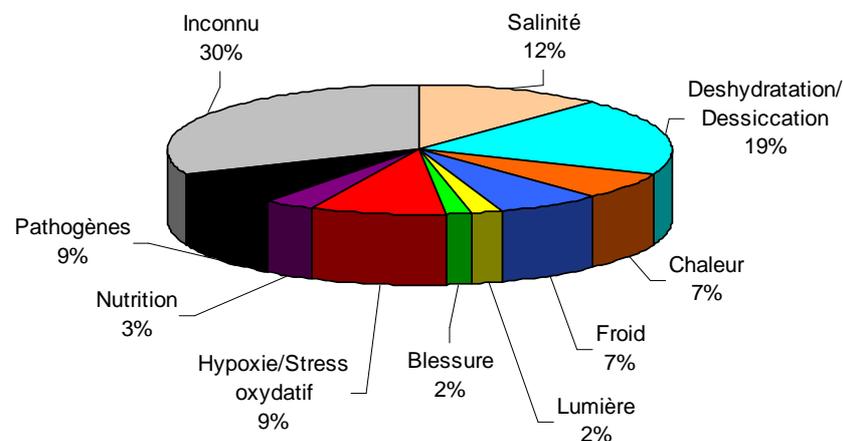


*B. Localisation subcellulaire des partenaires.*



Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu que MtSAP1 est une protéine activée en réponse aux stress. De ce fait, les partenaires d'interaction potentiels ont par la suite été classés en fonction de leur réponse aux stress, si celle-ci existe. Ce classement a été utilisé dans la figure 28 ci-dessous. Certains partenaires étant sensibles à plusieurs stress, chaque sensibilité a été prise en compte, augmentant le nombre de protéines totales représentées sur le graphique. Par exemple, la protéine DREB est induite par le froid et la déshydratation et serait impliquée dans les stress biotiques : elle est donc représentée à la fois dans la catégorie déshydratation, froid et pathogènes.

**Figure 28** : Répartition des partenaires potentiels de MtSAP1 obtenus en fonction des types de stress dans lesquels ils sont impliqués.



Le tableau 2 ci-après répertorie les différents partenaires mis en évidence. Leur classement a été réalisé comme précédemment, en fonction des stress auxquels ils sont sensibles. Compte tenu du peu d'études réalisées sur ces protéines chez *Medicago truncatula*, les travaux éclairant la fonction des partenaires potentiels ont souvent été réalisés chez d'autres plantes, en particulier chez *Arabidopsis thaliana*, chez le riz et le pois, ce dernier étant également une légumineuse. L'organisme concerné par les études référencées est spécifié, sauf dans le cas d'une revue. Lorsque c'est le cas, la présence de redondance est indiquée par le nombre de clones trouvés. Dans la littérature existante à ce jour, 18 candidats ne présentent pas d'activité particulière au cours des stress. Pour certains d'entre eux, aucune fonction n'a même été mise en évidence dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

Tableau 2 : Partenaires potentiels d'interaction avec SAP1 chez *Medicago truncatula*.

Nom	TC <i>Medicago truncatula</i>	Fonction/Implication dans la réponse aux stress	Référence(s)
<b>Réponse aux stress abiotiques.</b>			
<i>Stress hydriques/ Stress salins/ Tolérance à la dessiccation.</i>			
AGP : "glucose-1-phosphate adenylyltransferase"	TC109371	<i>Triticum aestivum (blé) &amp; Pisum sativum (pois)</i> . Inhibition sous stress hydrique. La répression du gène induit l'accumulation de sucres, diminue le stock d'azote disponible, stimule les voies de prolifération, augmente le métabolisme mitochondrial et les stress osmotiques. Elle génère ainsi des ROS, une activation de la transcription des gènes et des voies de signalisation de stress.	[216,217]
Alpha NAC-like protein : "Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein"	TC107013	<i>Oryza sativa (riz)</i> . Réponse aux stress salins.	[218]
DHN : "dehydrin"	TC101014	<i>Medicago truncatula</i> . Associée à la tolérance à la dessiccation. Réponse aux stress.	[219]
DREB : "dehydration responsive element binding protein"	TC95896	Facteur de transcription de la famille ERF. Se lie à des éléments de type cis-acting en réponse à la sécheresse. Induit par le froid et la déshydratation. Implication probable dans les stress biotiques.	[220]
LEA5 : "desiccation protective protein LEA 5"	TC105834	Accumulation à la fin de la maturation au moment de l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et pendant une sécheresse. Rôle protecteur.	[221]
METK : "s-adenosyl methionine synthetase"	TC106384 N° uniprot : A4PU48	<i>Oryza sativa (riz) &amp; Solanum lycopersicum (tomate)</i> . Induit par les stress salins.	[222,223]
OL3 : "oleosin 3"	TC94332	<i>Sorghum bicolor</i> . Induit en réponse aux stress osmotiques.	[224]
PM25L : "PM25 homolog"	TC107158	<i>Medicago truncatula</i> . Associé à la tolérance à la dessiccation. Réponse aux stress.	[219]

pRING : "putative RING zinc finger protein"	TC96103	<i>Oryza sativa (riz) &amp; Arabidopsis thaliana</i> . Induit par le froid. Tolérance à la sécheresse par activation de la voie de synthèse de l'ABA.	[225,226]
PSB2-1 : "proteasome subunit beta type 2-1"	TC107079	<i>Oryza sativa (riz)</i> . Induit par la mort cellulaire dépendante des stress salins.	[227]
<b><i>Stress thermiques/Stress lumineux/Stress physiques</i></b>			
Conglutine	TC100256	<i>Lupinus albus (lupin blanc)</i> . Induit par la chaleur. Réprimé par l'eau.	[228]
FAD6 : "omega-6 fatty acid desaturase"	TC94486	<i>Portulaca oleracea (pourpier) &amp; Gossypium hirsutum (coton)</i> . Induit par les stress physiques (blessure). Régulation par le froid et la lumière.	[229,230]
<b><i>Stress oxydatifs/ Stress hypoxiques/ Stress nutritifs</i></b>			
GAPDH : "glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase"	TC106518	<i>Arabidopsis thaliana</i> . Répresseur des stress oxydatifs. Contrôle la génération d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et supprime la mort cellulaire.	[231]
HR : "hypoxia-responsive family protein"	TC108106	<i>Homo sapiens</i> . Réponse à l'hypoxie.	[232]
LEGA : "legumin A"	TC100252	<i>Pisum sativum L (pois)</i> . Accumulation réduite sous stress nutritif.	[233]
LEGK : "legumin K"	TC100253	<i>Pisum sativum L (pois)</i> . Accumulation réduite sous stress nutritif.	[233]
SAP1 : " stress-associated protein 1"	TC95263	<i>Medicago truncatula</i> . Protéine appât. Surexprimé sous ABA, sous hypoxie et en réponse à la déshydratation. Voir chapitre 2 partie 1.	Article en soumission
<b>Réponse aux stress biotiques &amp; stress biotiques et abiotiques.</b>			
GST25 : "glutathione s-transferase "	TC107685	<i>Triticum aestivum (blé)</i> . Induit lors de la défense contre des stress biotiques.	[234]
HSP20 : "heat shock protein 20"	TC100455 N° uniprot : Q2HTU2	2 clones. <i>Oryza sativa (riz)</i> . Surexprimé sous stress thermique (chaleur). Modulation de l'expression par différents stress biotiques et abiotiques.	[235]
MBF : "multiprotein bridging factor"	TC101718	<i>Arabidopsis thaliana &amp; Solanum tuberosum (pomme de terre)</i> . Coactivateur transcriptionnel. Participe à la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (chaleur, salinité, osmose, déshydratation).	[236-240]
PAPF : "plastid-lipid-associated protein fibrillin"	TC107774	<i>Arabidopsis thaliana</i> . Réponse aux stress biotiques (défense contre les pathogènes).	[241]

<b>Protéines dont les fonctions en réponse aux stress sont inconnues.</b>			
ALR : "aldolase-like reductase"	TC104432	pas d'informations	-
EF1A : "elongation factor 1 alpha"	TC106485 N° uniprot : A2Q1J5	pas d'informations	-
eiF-5A-1 : "eukaryotic translation initiation factor 5A-1"	TC94697	pas d'informations	-
FER2 : "heterotrophic ferredoxin 2"	TC107246	pas d'informations	-
PPIA : "peptidyl-prolyl cis-trans isomerase"	TC95599	pas d'informations	-
PSF2 : "putative DNA replication complex GINS protein 2"	TC106430	pas d'informations	-
RPI : "ribose-5-phosphate isomerase"	TC107375	pas d'informations	-
SANP : "separation anxiety protein-like"	TC95781	pas d'informations	-
UBP12 : "ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12"	TC106520	pas d'informations	-
Inconnue : "flagelliform silk protein"	TC101128	pas d'informations	-
Inconnue : "HYP1 protein"	BF521545	pas d'informations	-
Inconnue : "little protein 1"	TC109750	pas d'informations	-
Inconnue	BE941896	pas d'informations	-
Inconnue	TC107009	pas d'informations	-
Inconnue	TC108306	pas d'informations	-
Inconnue	TC108406	pas d'informations	-
Inconnue	TC94279	pas d'informations	-
Inconnue	TC96359	pas d'informations	-

### III. Discussion et conclusion.

La protéine appât utilisée dans ce double hybride est constituée de la totalité de MtSAP1. Le but de cette étude a été de mettre en évidence des partenaires d'interaction qui permettraient de comprendre les rôles de MtSAP1 dans la graine, notamment lors de stress abiotiques. L'étude fonctionnelle du gène a mis en évidence l'implication de MtSAP1 dans la réponse à des stress abiotiques comme le traitement par l'ABA, la sécheresse, l'hypoxie ou le froid.

Le double hybride a été réalisé à partir d'une banque d'ADNc issue des transcrits de la graine sèche de *Medicago truncatula*. Nous avons mis en évidence une vingtaine de protéines interagissant avec MtSAP1. Toutefois, ces interactions ont été mises en évidence dans un modèle bactérien, ce qui ne permet pas de conclure sur l'existence de ces complexes *in vivo* mais d'obtenir une liste de candidats potentiels.

Pour la plupart, les candidats obtenus sont déduits de la séquence nucléique correspondante par comparaison avec des banques de données et ne sont pas référencées dans les bases de données protéiques. De ce fait, les fonctions ont été décrites selon les informations provenant d'autres organismes végétaux. Les candidats appartiennent à des familles de protéines peu hétérogènes. Globalement, les protéines sont impliquées dans la réponse aux stress, le stockage des réserves et les métabolismes cellulaires et protéiques. La présence de protéines ribosomales est très probablement due à la biosynthèse de MtSAP1, qui nécessite la liaison avec les ribosomes. Ces protéines ne sont donc pas considérées comme des candidats potentiels.

L'une des séquences cibles code la protéine appât elle-même, confirmant l'hypothèse d'une homodimérisation de MtSAP1 [242].

La localisation subcellulaire des partenaires potentiels est hétérogène, bien qu'elle soit inconnue pour 30% des candidats. La moitié des candidats connus sont des protéines cytoplasmiques ou nucléaires. L'étude *in silico* de MtSAP1 ne montre pas de séquence de localisation nucléaire. Néanmoins, l'analyse de la localisation cellulaire de MtSAP1 n'a pas été effectuée. Les protéines impliquées dans la survie à l'état sec, dont celles retrouvées dans ce double hybride (HSP20, LEA5), ont plusieurs localisations : HSP20 est nucléaire et cytoplasmique, LEA5 cytoplasmique et membranaire. MtSAP1 appartient à une famille de protéines capables d'être localisée dans le cytoplasme et dans le noyau. Ainsi, il est fort probable que MtSAP1 soit localisé au minimum dans ces deux compartiments.

Une proportion non négligeable de protéines ont des fonctions métaboliques ; dans ce cas, l'interaction avec MtSAP1 semble être non spécifique ou sans intérêt. Pourtant, certaines participent à la réponse aux stress abiotiques (cf. tableau 2). Les exemples de la GAPDH et de METK sont décrits ci-après.

La glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase (GAPDH), impliquée dans la voie glycolytique, est considérée comme un gène de référence, dont l'expression reste stable. Cependant, dans le cas d'un stress oxydatif, la transcription du gène est activée. Le peroxyde d'hydrogène induit l'expression transitoire de GAPDH, qui inhibe la formation de radicaux libres de l'oxygène (ROS). De même, la surexpression de GAPDH dans les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* induit une diminution du taux constitutif de ROS. Cette réduction du taux de ROS aboutit à l'annihilation de la mort cellulaire induite par la protéine pro-apoptotique Bax chez la levure. Parallèlement, la surexpression de GAPDH favorise la tolérance des cellules à l'apoptose induite par les chocs thermiques. GAPDH serait donc impliquées dans la régulation de l'état redox de la cellule [231]. L'étude réalisée dans la première partie de ce chapitre montre une surexpression de MtSAP1 sous traitement avec le peroxyde d'hydrogène. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une implication de l'interaction GAPDH/MtSAP1 dans la régulation du stress oxydatif. Toutefois, GAPDH étant une protéine aux fonctions métaboliques pleïotropes, elle est fortement exprimée dans toutes les conditions physiologiques et pathologiques, ce qui n'en fait pas un candidat privilégié à une étude plus poussée.

La protéine METK, ou S-adénosylmethionine synthétase, est une enzyme cytoplasmique impliquée dans le métabolisme carboné. Deux études, l'une chez le riz et l'autre chez la tomate, montrent l'induction de la transcription du gène en réponse aux stress salins [222,223]. Une interaction entre METK et MtSAP1 suite à un stress abiotique est possible. Cependant, les travaux réalisés dans la première partie montrent que l'expression de MtSAP1 n'est pas modulée par les stress salins, contrairement à ses orthologues du riz et d'*Arabidopsis thaliana*. Ces résultats suggèrent que MtSAP1 exprimé dans les embryons et axes embryonnaires de *Medicago truncatula* n'est pas régulé par les mêmes mécanismes que ses orthologues dans les tissus végétatifs. De plus, dans les 2 organismes, le gène est plus fortement exprimé dans les tissus lignifiés et les études portent sur la plante entière et non sur la graine [222,223]. De ce fait, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'interaction de METK avec MtSAP1 est aspécifique, due au domaine consensus A20 ou AN1. La présence de METK dans ce double hybride nous laisse supposer que d'autres protéines SAP existent chez

*Medicago truncatula*, qu'elles seraient exprimées plus tard ou dans d'autres organes de la plante et qu'elles seraient impliquées dans la réponse aux stress salins.

Parmi tous les candidats, nous avons choisi d'en retenir 3 pour une étude plus approfondie de l'interaction : MBF (« Multiple Protein Bridging Factor »), DREB (« Dehydration Responsive Element Binding Protein ») et HR (« Hypoxia-Responsive family Protein ». Ce choix a été motivé par leur fonction potentielle ou leur profil. L'interaction entre MtSAP1 et ces cibles dans le système double-hybride a été validé par une nouvelle cotransformation dans le système double hybride (expériences non présentées réalisées par Christine Gimeno-Gilles).

La protéine MBF est un coactivateur transcriptionnel : il interagit avec un facteur de transcription pour activer l'expression d'un gène sans se fixer directement à l'ADN. Dans le cas de MtSAP1, cette fonction est supposée. Il a été montré que l'orthologue StMBF1 de la pomme de terre interagit avec la protéine TBP, protéine de liaison à la TATA box. La transfection de StMBF1 dans la levure restaure le phénotype du mutant *mbf1*, montrant son rôle de coactivateur, et renforçant l'hypothèse d'une fonction conservée phylogénétiquement [239]. MBF1 est induit en réponse à la plupart des stress. StMBF1 participe à la réponse cellulaire suite aux stress oxydatifs [239] et l'extinction des 3 formes du gène chez *Arabidopsis thaliana* rend les plantes sensibles aux stress oxydatifs et osmotiques [240]. Chez l'Homme, MBF1 se lie aux facteurs de transcription de type bZIP et est crucial pour la réponse aux stress oxydatifs [243]. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'expression de l'isoforme a est induite par la déshydratation autant que par un fort taux de glucose. De plus, l'expression constitutive de MBF1 augmente la tolérance des lignées transgéniques au stress salin et rend les plantes insensibles au glucose [237]. Suzuki *et al.*, en 2005 et en 2008, a montré l'importance de l'isoforme MBF1c dans les voies de signalisation après différents stress, salins, osmotiques mais surtout après choc thermique. MBF1c s'accumule rapidement dans le noyau pendant le stress thermique et est requis pour la thermotolérance, pour la transcription de gènes de défense mais pas pour la transcription des gènes *HSP*. Les voies de signalisation de l'éthylène, de l'acide salicylique et du tréhalose jouent un rôle central dans la thermotolérance et MBF1 serait un régulateur clé de ces voies [236-238]. De plus, MBF1 régule l'expression d'ABR1, facteur de réponse à l'éthylène et inhibiteur de l'ABA, confirmant le rôle de MBF1 à la croisée des voies de signalisation du stress induites par l'ABA et l'éthylène [240]. Il est intéressant de noter que la surexpression de MBF1 augmente la résistance des plantes aux infections fongiques et bactériennes [237,238]. Au vu des ces informations, MBF1 semble être un candidat très intéressant pour l'étude des mécanismes

d'action de MtSAP1 au cours de la réponse aux stress. MtSAP1 est induit par le froid, alors que MBF1 l'est par la chaleur. De plus, MtSAP1 est impliqué positivement dans la voie de réponse à l'ABA, alors que MBF1 favorise la voie de l'éthylène aux dépens de celle de l'ABA. L'hypothèse est la suivante : MBF1 et MtSAP1 auraient des fonctions opposées et interagiraient lors de la thermotolérance. Le complexe serait un régulateur de l'une ou l'autre des voies, chaque partenaire ayant un rôle pivot entre la voie de l'ABA et celle de l'éthylène. La régulation de la liaison entre MBF1 et MtSAP1 pourrait être déterminante dans ces processus.

Des facteurs de transcription régulent l'expression de gènes liés au stress. Le second candidat, DREB, pour "dehydration responsive element binding protein" appartient à la classe des facteurs DREB/CBF. Ces facteurs se lient aux éléments cis-acting répondant au stress hydrique. DREB appartient à la famille ERF (« ethylene response factor »), composée des sous-classes DREB1/CBF et DREB2, induites respectivement par le froid et la déshydratation. Les protéines DREB sont apparemment impliquées dans la signalisation des stress biotiques. En manipulant leur expression, il est possible de modifier la tolérance au stress des plantes transgéniques [220]. La découverte d'une interaction entre MtSAP1 et DREB renforce l'hypothèse d'une fonction coactivatrice de MtSAP1 en réponse aux stress, notamment thermiques.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la protéine HR, ou « hypoxia-responsive protein », puisque MtSAP1 serait impliqué dans la réponse secondaire aux stress oxydatifs. Il n'y a pas de littérature existante à ce jour traitant de la protéine HR chez les plantes. Néanmoins, son orthologue, HIF-1 $\alpha$ , a été étudiée chez l'Homme. Tous les organismes sont sensibles à la concentration en oxygène et répondent à l'hypoxie en adaptant l'expression de gènes spécifiques. HIF-1 $\alpha$  est un régulateur transcriptionnel et un composant essentiel de l'homéostasie de l'oxygène. HIF-1 $\alpha$  est requis pour l'établissement des systèmes physiologiques clés régulant l'oxygénation cellulaire. De plus, il jouerait un rôle clé dans le cancer, les maladies cardiovasculaires et respiratoires [232]. Bien que peu d'informations soient à notre disposition concernant MtSAP1 et HR suite aux stress oxydatifs chez *Medicago truncatula*, l'étude *in vivo* de l'interaction entre ces 2 protéines permettrait d'éclaircir l'implication de MtSAP1 dans les stress oxydatifs.

Cette étude permet d'émettre quelques hypothèses quant aux fonctions de MtSAP1. Le modèle de fonctionnement possible est schématisé sur la figure 29. Ce modèle présenté est bien entendu totalement hypothétique et il est nécessaire de réaliser plusieurs expériences afin de le valider ou de le modifier. La perception d'un signal de stress de type basse température, déshydratation, hypoxie ou traitement par l'ABA mène à l'activation des voies de signalisation cytoplasmiques correspondantes. La signalisation induit l'expression et/ou l'activation de MtSAP1. Par la suite MtSAP1 cytosolique interagit avec des protéines spécifiques comme MBF pour inhiber les voies de signalisation opposées comme celle de l'éthylène en réponse au traitement à l'ABA. D'autre part, MtSAP1 est transloqué vers le noyau où il joue un rôle de coactivateur transcriptionnel, notamment en se liant à DREB ou à HR, pour induire l'expression de protéines permettant la protection de la cellule contre le stress initial.

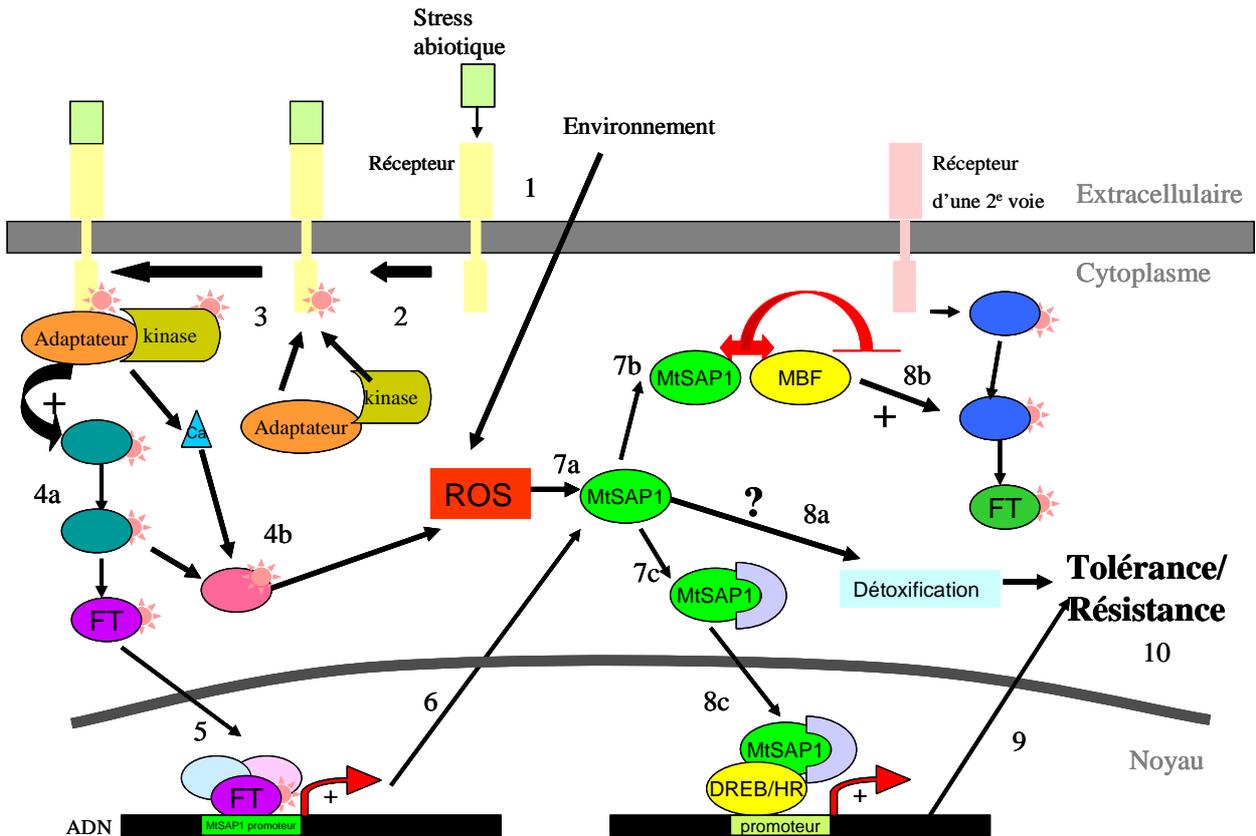
MtSAP1 présente une homologie importante avec 2 protéines humaines, ZNF216 et AWP1. De même, HR est un orthologue de HIF-1 $\alpha$  et MBF1 de EDF1. La recherche d'un orthologue de DREB chez l'Homme dans les banques de données n'a pas donné de résultats ; néanmoins, DREB possède un domaine consensus nommé AP2 présent chez des protéines humaines. Comme MtSAP1, les protéines ZNF216 (ou ZFAND5) et AWP1 (ou ZFAND6) contiennent un domaine A20 en N-terminal et un domaine AN1 en C-terminal [109,208]. La transcription du gène *ZNF216* est induite par plusieurs cytokines, dont le facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) [244]. Toutes deux sont fortement impliquées dans la régulation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B joue un rôle important dans la régulation de l'immunité, des réponses inflammatoires et anti-apoptotiques. Son activation nécessite l'activité de la kinase I $\kappa$ B, composée de 2 sous-unités catalytiques, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , et d'une sous-unité régulatrice, IKK $\gamma$ . ZNF216 interagit avec IKK $\gamma$  par le domaine A20 et inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  [109]. AWP1 est surexprimé dans les monocytes adhérents par comparaison avec les monocytes circulants et participe donc à l'inhibition de NF- $\kappa$ B [207]. De plus, la surexpression de ZNF216 sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  [109], est présente dans les cellules métastatiques du cancer nasopharyngien par rapport aux cellules non métastatiques [245] et serait un facteur inhibiteur de la différenciation des ostéoclastes [244]. Parallèlement il a été montré qu'AWP1 est exprimé ubiquitairement et que le gène est transcrit précocément durant le développement de l'humain et de la souris [208]. Enfin, les 2 protéines sont impliquées dans la dégradation des protéines par le protéasome dépendante des ubiquitines [209,246].

A notre connaissance il n'y pas de littérature proposant un lien entre les protéines SAP humaines et les orthologues EDF1, HIF-1 $\alpha$  et les protéines à domaine AP2. De plus, la littérature ne mentionne pas non plus de lien entre la protéine NF- $\kappa$ B et les protéines de la famille AP2 et EDF1. Par contre, plusieurs études montrent le lien entre NF- $\kappa$ B et HIF-1. HIF-1 $\alpha$  contrôle la réponse à l'hypoxie qui la stabilise et la protège de la dégradation par le protéasome. Mais elle est également activée en réponse à des stimuli en conditions normoxiques, incluant les facteurs de croissance et le TNF $\alpha$  ; de plus les ROS sont généralement impliqués. NF- $\kappa$ B régule la transcription de HIF-1 $\alpha$ , démontrant l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'induction de HIF-1 $\alpha$  par le TNF $\alpha$ . [247].

L'étude des orthologues de MtSAP1 chez l'Homme apporte de nouvelles informations pouvant être intéressantes dans la mise en évidence des fonctions de MtSAP1. En effet, l'expression précoce d'AWP1 durant l'embryogenèse de mammifères permet d'émettre l'hypothèse d'une fonction spécifique des protéines SAP dans l'embryogenèse et la maturation de la graine. En parallèle, l'implication des protéines dans la dégradation par le protéasome ouvre de nouvelles perspectives d'études quant aux fonctions de MtSAP1, notamment dans sa fonction impliquant l'interaction avec HR.

En conclusion, cette étude ouvre de réelles perspectives d'études sur les fonctions de MtSAP1 en réponse aux stress abiotiques, voire biotiques. Cependant, il serait nécessaire de cribler une nouvelle fois la banque parce qu'aucun candidat n'est référencé dans le processus de germination même. Manifestement, MtSAP1 joue un rôle clé dans la signalisation en réponse aux stress, notamment par ses interactions. Des expériences de coprécipitation *in vitro*, ou « pull down », sont en cours afin de prouver l'interaction entre MtSAP1 et ses 3 cibles, MBF, HR et DREB. Toutefois, les productions recombinantes des cibles posent problème, ce qui ne nous a pas permis de vérifier ces interactions pour le moment. La vérification *in vivo* par coimmunoprécipitation et la mise en évidence d'une colocalisation par immunofluorescence ou immunocytochimie sont envisagées ; néanmoins il est nécessaire de réaliser un anticorps spécifique de chaque protéine cible. L'anticorps anti-MtSAP1 a été produit spécifiquement et nous a permis d'étudier les variations de l'expression protéique en réponse aux différents stress. Cet anticorps sera utilisé pour définir la localisation subcellulaire de MtSAP1, ce qui permettrait d'infirmer ou de renforcer l'hypothèse d'une activité cytoplasmique et nucléaire. La vérification des interactions sera réalisée en premier lieu, permettant de définir la place de MtSAP1 dans la signalisation intracellulaire en réponse aux stress abiotiques. Dans un second temps, une étude des facteurs de transcription modulant son expression devrait être faite.

Figure 29 : Modèle de fonctionnement de MtSAP1 en réponse aux stress abiotiques.



(1) : Le signal de stress abiotiques ou environnementaux (□) se fixe au récepteur spécifique, induisant son activation (☀). Les protéines adaptatrices et les protéines kinases associées sont recrutées au niveau du récepteur activé (2) et sont à leur tour activées (3). (4) : s'ensuit une cascade d'activation des molécules de signalisation intracellulaire (●) ou de seconds messagers comme le calcium (Ca) (▲) menant à l'activation de facteurs de transcription (FT) ou de protéines effectrices spécifiques (●).

(5) : le facteur de transcription (FT) activé est transloqué dans le noyau où il s'associe avec des protéines coactivatrices (●●), se fixe sur les séquences spécifiques du promoteur de *MtSAP1* et active la transcription et donc la production de *MtSAP1* (6). (7) : *MtSAP1* a plusieurs fonctions dans la réponse. Parallèlement, les stress environnementaux peuvent générer la production de ROS, perçus par divers mécanismes dans lesquels *MtSAP1* pourrait être impliqué (7a). Dans le cytoplasme, *MtSAP1* interagirait avec des effecteurs cellulaires tels que MBF (7b) pour inhiber son action. En parallèle, *MtSAP1* serait transloqué dans le noyau avec une protéine d'import nucléaire (7c). (8) : Par son rôle probable de senseur des ROS, *MtSAP1* serait impliqué dans la détoxification (8a). L'interaction *MtSAP1*/MBF inhiberait l'activation d'autres voies de signalisation (8b ●●). *MtSAP1* en tant que coactivateur se lierait avec des facteurs de transcription comme DREB ou HR induisant la transcription génique (8c) et donc la production de protéines effectrices (9). (10) : L'action de *MtSAP1* participerait à la tolérance ou à la résistance de la cellule aux stress initiaux.

**CHAPITRE 3 :**  
**INTERACTIONS PROTEINIQUES :**  
**APPLICATION EN SANTE.**

## Avant-propos.

Le cancer existe depuis que la vie existe, aussi bien chez les plantes que chez les animaux, de l'insecte à l'Homme. Pathologie grave, elle se traduit par une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire. En détruisant son environnement, le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'être vivant. Cette maladie apparaît peu dans notre histoire, ce qui est normal car, d'une part, le diagnostic de cancer était méconnu dans de nombreux cas, et d'autre part, la moitié des cancers est diagnostiquée après 65 ans.

Aujourd'hui, le cancer est un véritable problème de santé publique. Selon le rapport annuel de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), publié en décembre 2008, cette maladie sera la première cause de mortalité dans le monde d'ici 2010, détrônant les maladies cardio-vasculaires, et le nombre de cas devrait doubler d'ici 2030. Les facteurs de risques sont internes (mutation, hérédité génétique, induction par un agent infectieux...) et/ou externes (alimentation, irradiation, tabac). Plusieurs types de cancers semblent en augmentation, pour des raisons environnementales ou de modes de vie, ainsi qu'en raison du vieillissement de la population. Les taux de cancers détectés augmentent dans chaque tranche d'âge, une meilleure détection qu'autrefois ayant aussi un rôle dans cette augmentation.

Parmi les divers cancers, les cancers du côlon et du rectum sont parmi les plus fréquents. Avec plus de 36 000 nouveaux cas et environ 17 000 décès par an, c'est le second cancer, en termes de fréquence, tout sexe confondu. Chaque jour en France, 100 personnes apprennent qu'elles ont un cancer colorectal. Il s'agit essentiellement d'un cancer de l'âge mûr, près de 85 % des cas survenant après 65 ans. Après l'âge, les facteurs de risques secondaires sont les maladies héréditaires (ou plus rarement les maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn) qui favorisent le développement de tumeurs. Les formes héréditaires sont rares (moins de 5% des cas) même si un antécédent familial est retrouvé dans près d'un cinquième des cas. Enfin, la sédentarité et l'alimentation trop riche en graisses augmentent le risque [248-250].

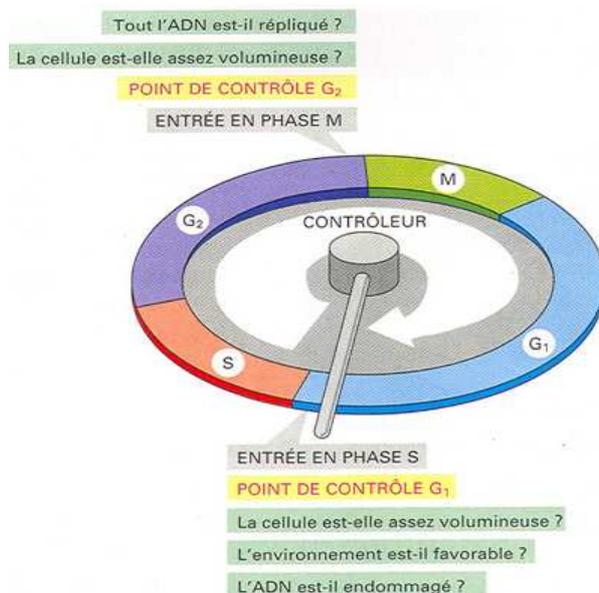
La lutte contre le cancer représente donc plus que jamais un enjeu primordial pour la société occidentale et est déclarée cause nationale depuis 2003 en France. Aujourd'hui la recherche porte sur plusieurs axes : la compréhension des bases moléculaires des mécanismes de l'oncogenèse, la mise en évidence de marqueurs pronostics, de cibles thérapeutiques, et le développement de thérapeutiques adéquates.

Les cellules cancéreuses dérivent toutes d'un même clone, cellule initiatrice qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Les mécanismes moléculaires aboutissant à la tumorigenèse mènent à 2 phénomènes majeurs, la prolifération en continue associée à l'inhibition des mécanismes de mort.

Tous les organismes eucaryotes, animaux, végétaux et microorganismes, sont composés de cellules qui se reproduisent par division. Flemming décrivit cette division en deux étapes majeures : division cellulaire proprement dite et croissance. Il observa la répétition de ces deux étapes de manière cyclique et supposa l'existence d'un mécanisme régulant l'enchaînement de ces étapes, mécanisme appelé aujourd'hui cycle cellulaire.

Le rôle majeur du cycle est d'assurer la bonne transmission de l'information génétique de la cellule mère vers les deux cellules filles. Il se compose de quatre phases majeures schématisées sur la figure 30. Au cours la première phase appelée G1 (« Gap1 »), la cellule intègre les différents signaux de son environnement mais aussi les signaux internes. La seconde phase est la phase de réplication de l'ADN appelée phase S (« Synthesis ») ; la cellule réplique son matériel génétique et le centrosome. Suit la phase appelée G2 (« Gap2 ») où la cellule contrôle la réplication et prépare la mitose. Enfin la dernière phase est la division cellulaire plus connue sous le nom de mitose (M) où les chromosomes sont séparés en deux lots exactement identiques entre les deux cellules filles.

Figure 30 : Cycle cellulaire.



Réf. : <http://www.humans.be/bio%20cell2%20cycle%20cellulaire.html>

Les cellules cancéreuses se caractérisent dans un premier temps par une dérégulation de leur cycle cellulaire, ce qui leur permet d'envahir petit à petit le tissu environnant. Les évènements moléculaires aboutissant à cette dérégulation sont multiples : dommages sur l'ADN et/ou activation constitutive de protéines pro-prolifératives. Ces évènements provoquent un détournement des systèmes intracellulaires de protection que sont les points de restriction des phases du cycle cellulaire, les systèmes de réparation de l'ADN et l'induction de la mort cellulaire. Parallèlement, les systèmes encourageant la prolifération sont stimulés.

L'inhibition des systèmes de protection de la cellule nécessitent la modification de l'expression ou des fonctions de protéines liées notamment à la progression du cycle cellulaire. Ces modifications sont dues à l'activité d'oncogènes. L'oncogène est une protéine capable de transformer des cellules et d'induire des tumeurs. Il existe des oncogènes de type viral ou bactérien, et des proto-oncogènes, terme traduisant le fait que des protéines cellulaires sont potentiellement oncogéniques. Les oncogènes perturbent le cycle cellulaire, l'adhérence cellulaire et l'apoptose.

De ce fait, les stratégies thérapeutiques se portent sur l'inhibition des oncogènes et l'activation des protéines anti-prolifératives. Les deux protéines étudiées ici, STAT3 et p21, jouent des rôles primordiaux dans la prolifération cellulaire et sont affectées au cours de la transformation cellulaire oncogénique. STAT3 est un proto-oncogène qui, activé, favorise grandement les processus oncogéniques. Au contraire, l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 est activé en réponse à différents stress dont les dommages sur l'ADN afin de protéger la cellule.

STAT3 et p21, bien qu'ayant des fonctions globalement opposées, représentent des cibles importantes des stratégies thérapeutiques. Leurs fonctions au sein de la cellule, décrites dans ce chapitre, ont été très étudiées ; cependant, certaines activités font l'objet de controverses ou sont encore floues. C'est pourquoi nous avons choisi un nouvel axe d'étude de ces protéines, en mettant en évidence de nouveaux partenaires d'interactions. Ce chapitre traite dans un premier temps du double hybride de STAT3 puis dans un second temps de celui de p21 et enfin de la description d'un nouveau complexe protéique impliquant p21.

## **Partie 1 : Double hybride de STAT3.**

### **I. STAT3, facteur de transcription et puissant oncogène.**

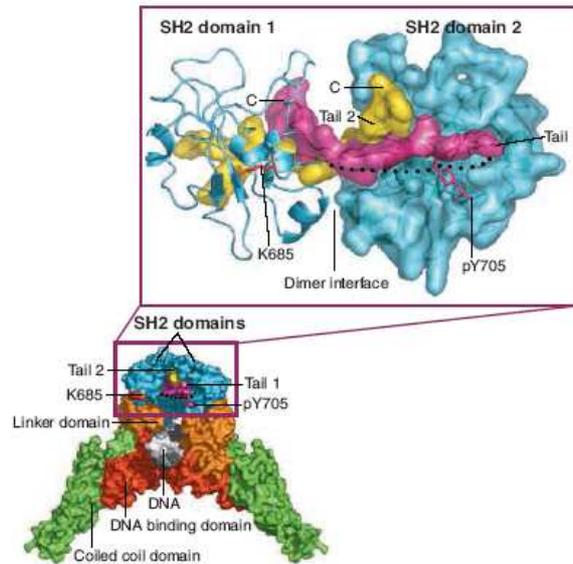
#### **1. La protéine STAT3.**

La famille des facteurs de transcription STAT, pour « signal transducer and activator of transcription » comportent chez les mammifères 7 membres, dont STAT3. STAT3 est impliqué dans de nombreux processus liés à la tumorigenèse et à la réponse immunitaire. Il a été cloné et purifié en 1994 sous le nom APRF, pour « acute-phase response factor » suite à l'étude de la voie de signalisation de la protéine gp130 activée par diverses cytokines [251]. Le gène est localisé en 17q21, à proximité des gènes de 2 membres de la même famille, STAT5a et STAT5b [252]. STAT3 est une protéine composée de 770 aa et de masse moléculaire de 92kDa subissant des modifications post-traductionnelles de type acétylation et phosphorylation (cf. figure 31).

Les STATs sont activés par différents mécanismes. Cependant le schéma global est le suivant : suite à un stimulus extérieur, les récepteurs activés vont phosphoryler STAT, provoquant sa dimérisation et sa relocalisation vers le noyau où les facteurs STATs se fixent à l'ADN et modulent l'expression de gènes cibles.

STAT3 présente différents domaines schématisés sur la figure 31 : un domaine « coiled-coil », le domaine de liaison à l'ADN, le domaine SH2 et le domaine de transactivation, respectivement de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale.

**Figure 31** : Représentation tridimensionnelle du dimère STAT3.



Représentation de l'homodimère activé STAT3. Les 4 domaines de STAT3 sont représentés : les domaines « coiled-coil » en vert, les domaines de liaison à l'ADN en rouge, les domaines de transactivation en orange et les domaines SH2 en bleu. L'ADN double brin lié à STAT3 est représenté en gris. L'interface du dimère des 2 domaines SH2 est détaillée, montrant la lysine 685 acétylée en rouge et la tyrosine 705 phosphorylée en rose.

Réf. : <http://www.gghjournal.com/volume21/2/ab15.cfm>.

Le domaine de liaison à l'ADN est, comme son nom l'indique, essentiel pour la fixation de STAT3 sur la chromatine. Ce sont plus particulièrement les arginines 414 à 417 (R414 et R417) qui sont responsables de la liaison suite à la dimérisation du facteur de transcription [253]. Le domaine SH2, commun à de nombreuses protéines de signalisation, forme une poche à la surface de la protéine permettant l'interaction avec d'autres protéines de signalisation activées, *via* leurs tyrosines phosphorylées, telles que les récepteurs membranaires [254]. Les STATs sont activés par liaison de leur domaine SH2 aux récepteurs, mais les résidus critiques des récepteurs peuvent varier : dans le cas du récepteur à l'hormone de croissance, la région membranaire proximale est suffisante pour activer STAT3 alors que la région distale est nécessaire à l'activation de STAT5 [255]. STAT3, activé et cytoplasmique, est capable de se dimériser à la fois avec lui-même mais aussi avec d'autres facteurs STATs comme STAT1 [256], induisant sa relocalisation vers le noyau [254]. Par la suite, il recrute divers cofacteurs afin de se fixer sur la chromatine décondensée et ainsi moduler les gènes cibles.

Le domaine C-terminal de transactivation est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de STAT3. Trois résidus sont particulièrement déterminants. La lysine 685 (K685) est acétylée par l'histone acétyl-transférase CBP/p300, ce qui stabilise le dimère lié à l'ADN [257]. Deux acides aminés subissent des phosphorylations, modulant l'activité de transcription de STAT3. L'activation maximale de STAT3 n'est possible qu'après phosphorylation de ces résidus [258]. La tyrosine 705 (Y705) phosphorylée notamment par les récepteurs membranaires induit la dimérisation et donc l'activation de STAT3 dans le cytoplasme, aboutissant à sa translocation nucléaire. Dans le noyau, la sérine 727 (S727) phosphorylée est nécessaire à l'activité transcriptionnelle (cf. figure 32). Zhao *et al.* émet l'hypothèse d'un recrutement de cofacteurs tels que CBP suite à cette phosphorylation. Cependant, S727 peut être phosphorylée dans le cytoplasme, bloquant ainsi la liaison de STAT3 avec les récepteurs membranaires, la phosphorylation de Y705 et par conséquent l'activation du facteur de transcription [259].

Facteur de transcription latent dans le cytoplasme, STAT3 est transloqué dans le noyau après activation et dimérisation. Une fois les gènes cibles activés, STAT3 est exporté vers le cytoplasme ; 3 signaux d'export nucléaire ont été décrits, ils sont situés entre les aa 306 à 318, 404 à 414 et 524 à 535 (cf. figure 32). Le premier semble essentiel dans l'export après stimulation, alors que les deux autres joueraient plutôt un rôle dans la régulation basale de cet export [260].

STAT3 est le membre le plus pleiotropique des STATs et sa présence est essentielle : l'absence du gène chez des souris est létale au stade embryonnaire, et induit des déficiences des organes où le gène est inactivé [261-264].

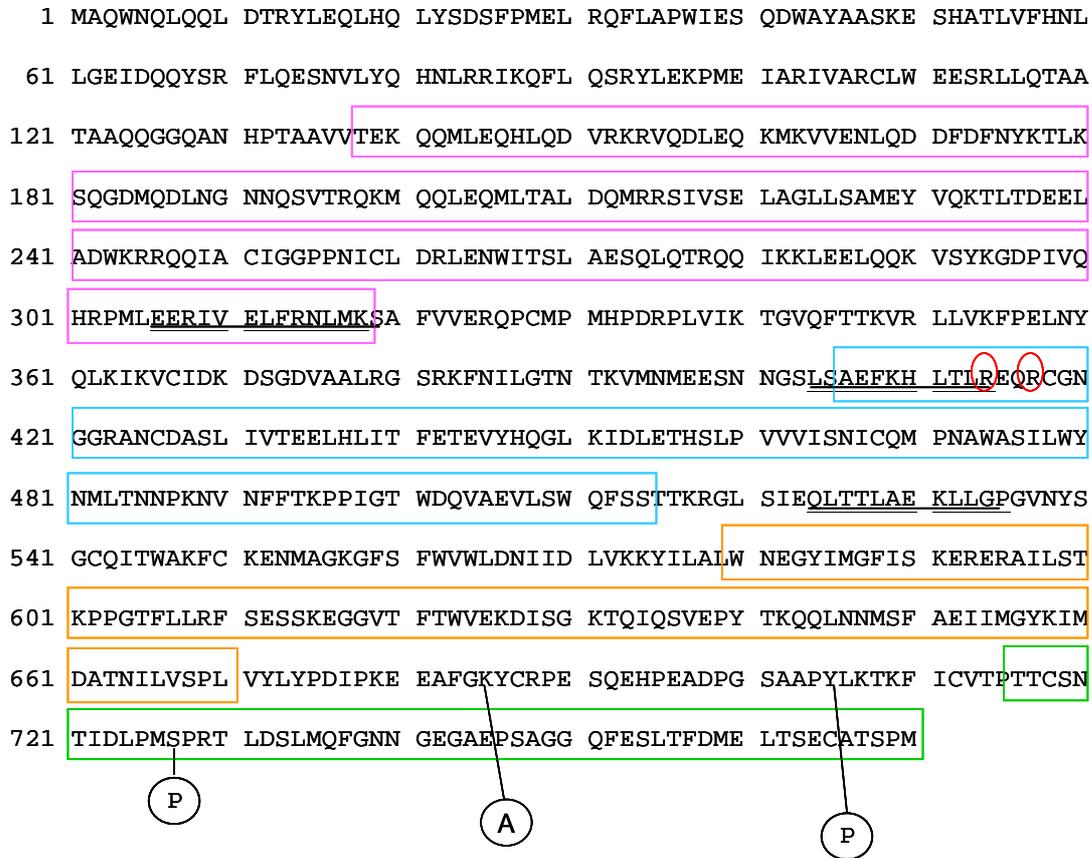
## 2. STAT3, facteur de transcription.

### a. Activation de STAT3.

La régulation transcriptionnelle du gène *STAT3* est très peu étudiée. Poietti *et al.* a mis en évidence l'activité stimulatrice des progestines, analogues synthétiques de la progestérone, sur la transcription du gène. En retour, la croissance des cellules cancéreuses du sein favorisée par la progestine nécessite l'action de STAT3 [265].

En réalité, la régulation de STAT3 s'effectue après modifications post-traductionnelles. STAT3 est activé suite à la stimulation de nombreux facteurs de croissance et cytokines, dont l'interleukine-6 (IL-6) [251] et le facteur de croissance épidermique [266], mais également par des oncogènes comme Src [267] et Ras [268].

**Figure 32** : Séquence primaire de STAT3,  
domaines et modifications post-traductionnelles.



*Légende :*

: domaine « coiled-coil »

: domaine de liaison à l'ADN

: domaine SH2

: domaine de transactivation

R : arginines impliquées dans la liaison à l'ADN

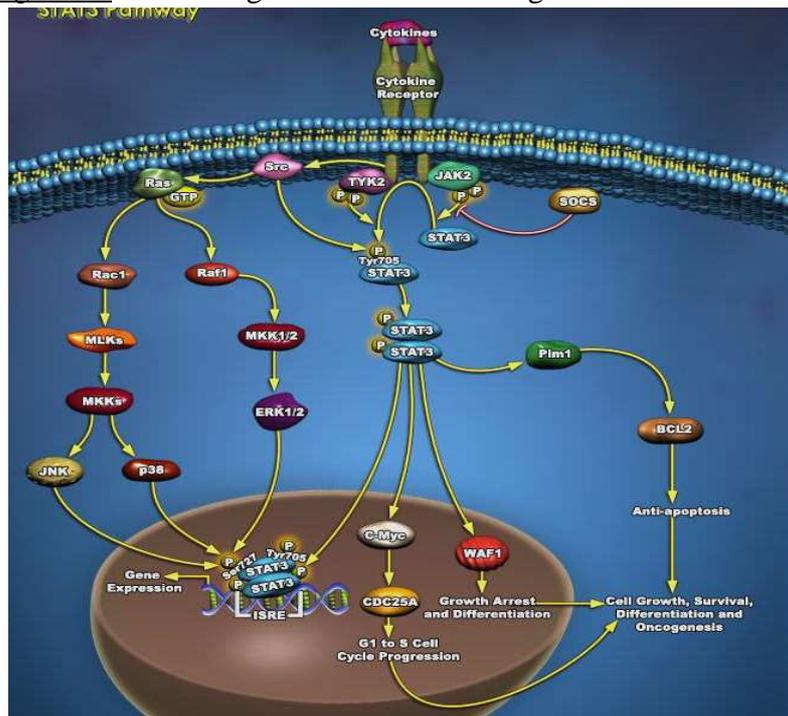
P : phosphorylation

A : acétylation

EERIVELFRNLMK, LSAEFKHLTLR, QLTTLAEKLLGP : signaux d'export nucléaire

La figure 33 ci-dessous donne un aperçu des voies de signalisation activées dans la réponse à la stimulation. De plus, STAT3 peut être activé par des agents carcinogènes ou par des stimuli extracellulaires (leptines, bile, choc osmotique). A l'inverse, de nombreux agents inhibent son activité : caféine, resvératrol, platine, capsaïcine, acide rétinoïque par exemple [111].

Figure 33 : Schéma global de la voie de signalisation de STAT3.



Les cytokines activent leurs récepteurs spécifiques, où des kinases spécifiques phosphorylent STAT3. Activé, STAT3 s'homodimérise ; une partie est active dans le cytoplasme et la majorité est relocalisée vers le noyau. STAT3 nucléaire subit la phosphorylation sur S727, et induit l'expression des gènes cibles. *Réf.* : <http://www.ambion.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=STAT3%20Pathway>.

L'activation de STAT3 est déterminée par l'état de phosphorylation des résidus Y705 et S727. La tyrosine 705 est essentielle pour l'activation de STAT3 dans le cytoplasme ; elle est phosphorylée par des protéines kinases, récepteurs ou non, tels que le récepteur de l'EGF [269], les kinases cytoplasmiques JAK et ERK [270-273] ou tel que l'oncogène Src [267]. Cette phosphorylation est le déclencheur de la dimérisation de la protéine (cf. figure 33).

Après translocation de STAT3 dans le noyau, c'est la phosphorylation de S727 qui joue un rôle prépondérant dans l'activité transcriptionnelle. De nombreuses kinases comme PKC $\delta$  [274], les kinases ZIP [275], les MAP kinases et cdk5 [276] activent STAT3 par phosphorylation de S727. En effet, l'inhibition de la phosphorylation de S727 empêche le

recrutement de CBP/p300 et diminue l'acétylation des gènes activés par STAT3 [259]. A l'inverse, la déphosphorylation de S727 est fréquemment réalisée pour inhiber l'activité de STAT3 ; la phosphatase PP2A est relocalisée dans le noyau et déphosphoryle S727 dans les lymphocytes T [277]. D'autres mécanismes entrent en jeu pour inhiber l'activité transcriptionnelle de STAT3 : interaction directe et indirecte, modulation de la concentration. La cycline K virale et l'E3 ligase PIAS3 s'associent au domaine d'activation et inhibent la liaison à l'ADN [278,279], l'inhibiteur des complexes cycline/cdk p21 inhibe son activité transcriptionnelle par interaction en empêchant le recrutement du coactivateur CBP [280] et la liaison cycline D1/STAT3 induit une diminution du taux de STAT3 dans le noyau sans effet sur le taux cytoplasmique, participant ainsi à une boucle de rétrocontrôle négatif de STAT3 [281].

La dégradation par le protéasome est également un acteur de la régulation de STAT3 : Daino *et al.* montre que l'apoptose induite par ajout d'ubiquitines exogènes nécessite la dégradation sélective de protéines telles que STAT3 par ubiquitination et protéolyse [282]. De plus, STAT3 peut être clivé puis dégradé par les caspases, menant à une réduction du taux de complexe STAT3/ADN et à une diminution de certains gènes induits par la forme native de STAT3 ; le clivage de la protéine est de plus corrélé avec une sensibilité aux stimuli apoptotiques accrue [283]. Enfin, STAT3 est acétylé sur les lysines 49, 87 et 685 par CBP/p300, stabilisant le dimère et augmentant son activité transcriptionnelle [257,284].

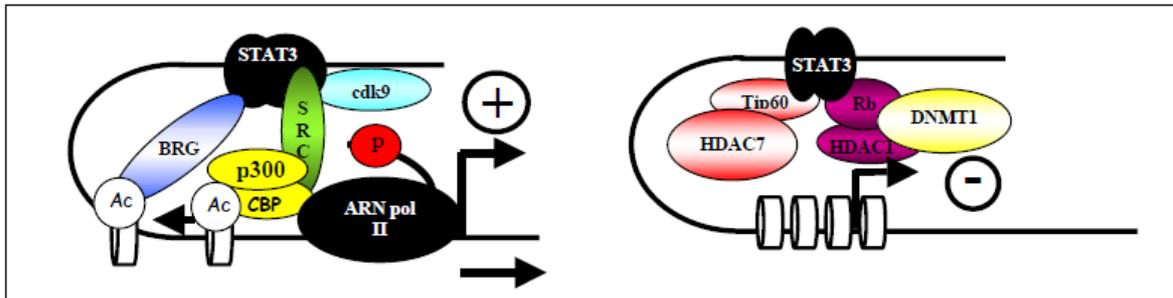
STAT3 est donc un facteur de transcription finement régulé par divers mécanismes, ce qui souligne l'importance de son rôle au sein de la cellule.

#### b. Mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes cibles.

L'activation de la transcription d'un gène nécessite plusieurs étapes, induisant la décondensation et le remodelage de la chromatine, puis la fixation et l'activation de l'ARN polymérase II sur le promoteur du gène cible (cf. figure 34). Après dimérisation et translocation dans le noyau, STAT3 mobilise des cofacteurs nécessaires à l'activation transcriptionnelle. Dans un premier temps, des coactivateurs tels que SRC1A, CBP et p300 sont recrutés au niveau de la chromatine et acétylent les histones. Simultanément le complexe de remodelage de la chromatine BRG/BRM intervient [285,286]. SRC1A et BRG interagissent directement avec STAT3 au niveau du domaine de transactivation. Les histones acétylases CBP et p300 interviennent uniquement lorsque STAT3 est lié à SRC1A, acétylent les histones ce qui induit un relâchement de la chromatine, permettant l'accès au promoteur du gène cible par modulation du nucléosome. Le remodelage de la chromatine effectué,

l'ARN polymérase II peut être chargée sur l'ADN. STAT3 recrute cdk9 qui phosphoryle le domaine CTD (« carboxy terminal domain ») de l'ARN polymérase II afin de l'activer [287]. STAT3 provoque donc l'initiation de la transcription et régule le remodelage de la chromatine ainsi que l'élongation de la transcription [286].

Figure 34 : STAT3 module la transcription.



Le facteur de transcription STAT3 peut induire ou réprimer la transcription. L'activation de la transcription nécessite le recrutement direct de plusieurs coactivateurs tel que BRG, CBP et cdk9. A l'inverse lorsque STAT3 induit une répression transcriptionnelle il recrute des corépresseurs tels que les HDAC ou DNMT1. *Réf.* : [288] Vigneron A. Thèse de doctorat : Rôle des facteurs de transcription STAT3 dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérase. Implication dans la résistance aux traitements de chimiothérapies. Université d'Angers, 2006.

Il a été démontré que STAT3 était aussi un inhibiteur de la transcription. STAT3 recrute Tip60 ainsi que l'histone déacétylase HDAC7 [289], et par exemple induit la fixation du complexe DNMT1-HDAC1 sur le promoteur du gène SHP-1 [290]. Ainsi des îlots CpG du gène sont méthylés, inhibant l'activation du gène par d'autres facteurs de transcription. Enfin, il est à noter que STAT3 s'associe avec deux régulateurs du cycle cellulaires, Rb et p21, et réprime la transcription [291,292]. Suite à une stimulation par le peroxyde d'hydrogène, STAT3 forme un complexe répresseur avec Rb pour bloquer l'induction de la transcription de cdc25a. A l'inverse, c-myc et STAT3 coopèrent pour induire l'expression de cdc25a ; cette activité transcriptionnelle physiologique est régulée par Rb [291]. De plus, la voie de signalisation PI3K/Akt inhibe l'activation transcriptionnelle de p21 par STAT3 sans altérer celle de myc [293].

Le rôle de STAT3 dans la cellule est donc de traduire un signal extracellulaire en une régulation transcriptionnelle de gènes cibles, qui sont nombreux et variés. L'effet de l'activation de STAT3 sur la cellule est donc dépendant du stimulus perçu en amont,

cependant l'activation de STAT3 se traduit généralement par une régulation positive du métabolisme cellulaire, favorisant les processus de survie et inhibant ceux de mort.

### 3. Fonctions de STAT3.

#### a. Conséquences de l'absence de STAT3.

L'absence de STAT3 chez des souris induit une mort précoce des embryons au stade trophoblaste et est létale même dans les cellules souches embryonnaires [264,294]. De ce fait, l'étude de l'absence de STAT3 a été réalisée par délétion conditionnelle. Malgré l'importance de STAT3 au stade embryonnaire, son absence dans les tissus induit des phénotypes peu marqués. Tous les tissus se développent normalement ; ce sont leurs réponses à des cytokines particulières qui sont modifiées. Selon les tissus, l'absence de STAT3 affecte la migration, la survie, la prolifération ou l'apoptose, ou augmente la réponse inflammatoire et diminue la réponse de phase aigüe [295]. STAT3 semble essentiel aux premiers stades du développement embryonnaire mais ne serait pas indispensable à la viabilité des cellules adultes normales différenciées.

#### b. Implication de STAT3 dans l'inflammation.

L'inflammation est une réaction immunitaire des tissus à une agression. STAT3 en est un médiateur et est un pivot de la réponse des cytokines. Les travaux qui ont mis en évidence l'existence de STAT3 portaient sur les protéines impliquées dans la réponse en phase aigüe [251] suite à la stimulation des cellules par les cytokines de la famille de l'IL-6 et par d'autres agents pro-inflammatoires. Les études suivantes ont confirmé son implication dans l'inflammation. Par ailleurs, l'activation de STAT3 par l'IL-6 nécessite la cyclooxygénase 2, enzyme pro-inflammatoire [296] et est liée aux rôles de l'IL-11 dans l'inflammation associée à la transformation oncogénique [297]. Cependant, la majorité des études fonctionnelles de STAT3 concluent à une fonction oncogénique et sont axées sur sa participation à la tumorigenèse.

#### c. Implication de STAT3 dans la tumorigenèse.

##### *i. Activation de STAT3 dans les tumeurs.*

Aucune mutation du gène *STAT3* n'a été retrouvée au sein des tumeurs ; pourtant STAT3 agit comme un oncogène, notamment par l'action d'autres oncogènes. Parmi ceux-ci, certaines protéines de fusion issues de translocation chromosomiques ont été mises en

évidence : Bcr-Abl, NPM-ALK et Tel-JAK, impliquées dans les cancers du système immunitaire, activent STAT3. Dans le cas de NPM-ALK, l'activation de STAT3 est même une condition *sine qua non* au développement tumoral [299-301]. STAT3 est également activé dans divers carcinomes (poumon, foie, colon), fait partie des évènements précoces de la formation des tumeurs de la peau chez des souris et induit le développement d'adénomes gastriques chez toutes les souris portant une forme constitutivement activée de STAT3 [302-304]. L'activité oncogénique de STAT3 n'est pas relié à une modification génique ou au taux de protéines intracellulaires, mais à son état d'activation dans les cellules transformées. L'inoculation d'une forme constitutivement active de STAT3 chez les souris provoque la formation de tumeurs [305]. Cependant, l'activation de STAT3 n'est pas toujours absolument requise pour le développement tumoral.

Particulièrement, l'activité oncogénique de STAT3 est liée à 2 protéines de signalisation fréquemment dérégulées dans les tumeurs et qui activent STAT3 : Src et le récepteur à l'EGF [306]. STAT3 est un acteur du potentiel transformant de l'oncogène viral v-src [305]. V-src induit le recrutement de STAT3 au niveau des gènes cibles c-myc, p21, cycline D1 et BCL-XL, impliqués dans la transformation oncogénique, la prolifération et la protection contre l'apoptose [307-310]. La forme humaine C-src potentialise l'activité transformante de l'EGFR [311] et est fréquemment surexprimée dans les cancers colorectaux, participant à la tumorigenèse [312] ; le recrutement de c-src par l'EGFR provoque l'activation de l'EGFR par phosphorylation [313,314]. Parallèlement, une activation constitutive de l'EGFR est fréquemment retrouvée dans ce type de cancer [315]. L'EGFR activé induit l'activation de STAT3 et ainsi la production de protéines de survie et de prolifération cellulaire, mais ce phénomène est très dépendant des types cellulaires et de stimulation de l'EGFR [316]. De plus, Choi *et al.* a mis en évidence l'activation constitutive de STAT3 suite à des mutations de l'EGFR ou à la liaison de ses ligands [317].

*ii. STAT3 module tous les aspects de la tumorigenèse.*

STAT3 est un facteur de transcription induisant la production de nombreuses protéines directement impliquées dans la progression tumorale [318]. STAT3 active la transcription de gènes régulant la prolifération cellulaire, protégeant la cellule contre les processus antiprolifératifs comme l'apoptose ou la sénescence, favorisant la néoangiogenèse, l'invasion et l'agressivité des tumeurs, ainsi que les gènes répondant aux stress de type oxydatifs (cf. figure 35). STAT3 activé permet à la cellule de proliférer sans cesse et simultanément inhibe les processus antiprolifératifs. La transformation oncogénique cellulaire nécessite un affranchissement des signaux de prolifération extracellulaires et intracellulaires. STAT3

active l'expression d'Akt, qui déconnecte la cellule des signaux extracellulaire [319], mais également de régulateurs intracellulaires comme c-myc et la cycline D1, entre autres [320]. Parallèlement, STAT3 annihile les mécanismes protecteurs d'une prolifération tumorale. Il empêche l'entrée de la cellule en sénescence réplivative due à l'instabilité génomique créée par une prolifération excessive, et ce en activant la télomérase [321]. De plus, il active la production des protéines anti-apoptotiques Mcl1, BCL-XL et survivine [320]. Particulièrement, la surexpression de la survivine est intéressante : elle inhibe la perméabilisation mitochondriale et l'activation des caspases, perturbe le processus mitotique et induit l'instabilité génomique [322]. Enfin, STAT3 prévient l'activation de l'endonucléase Eme-1, limitant les dommages sur l'ADN et augmentant la survie cellulaire [323].

Depuis peu, il a été découvert que STAT3 était également présent dans la mitochondrie de cellules en culture et de tissus primaires. La forme mitochondriale est requise pour le fonctionnement optimal de la chaîne de transport des électrons ; cette fonction de STAT3 lui permettrait d'orchestrer les réponses à l'homéostasie cellulaire [324]. En outre, STAT3 régule des fonctions métaboliques dans la mitochondrie afin de faciliter la transformation maligne par Ras [325].

Comme beaucoup de protéines oncogéniques, STAT3 favorise donc les mécanismes de prolifération, inhibe l'apoptose et la sénescence. Cependant, STAT3 présente d'autres fonctions, conférant plus d'agressivité et de résistance à la cellule tumorale. La prolifération en continue de ces cellules cancéreuses aboutit à l'invasion des tissus environnants puis à la formation de métastases, 2 processus dans lesquels STAT3 est actif.

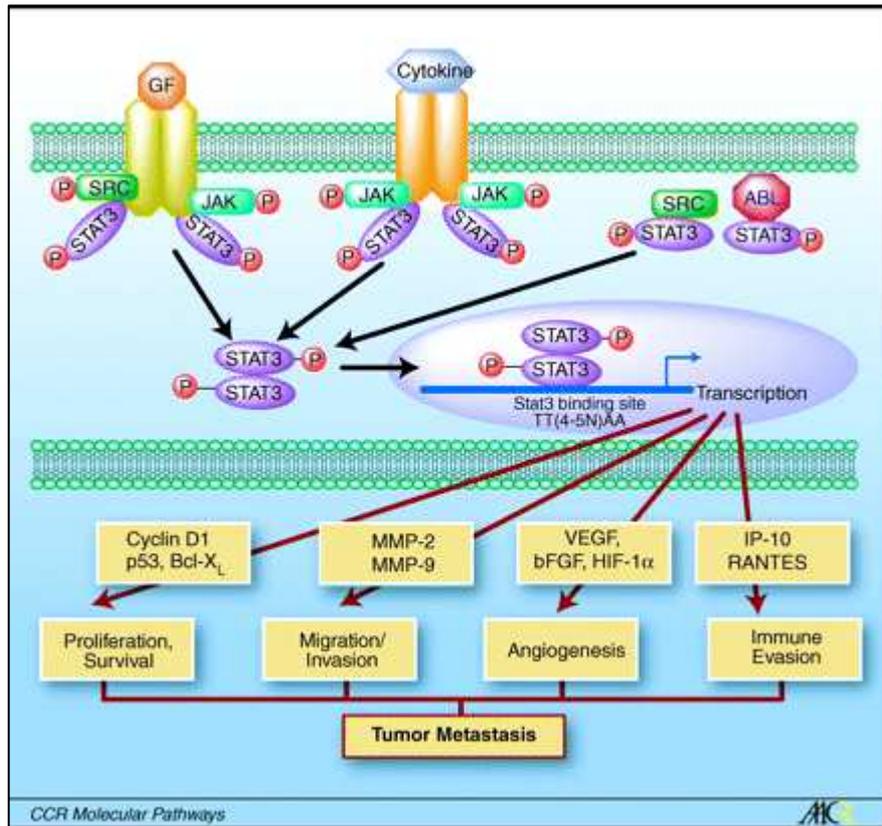
La matrice extracellulaire est importante dans le contrôle des cellules des organes adjacents. STAT3 active la dégradation de la matrice [326-328], permettant non seulement à la cellule d'échapper à un autre mécanisme antiprolifératif mais aussi aux cellules de migrer à travers le stroma. De plus, l'activation de STAT3 dans des tumeurs murines perturbe l'attachement des cellules à la lame basale, provoquant la destruction de celle-ci et facilitant la formation de métastases lymphatiques [329]. Par la dégradation de la matrice extracellulaire et de la lame basale, et par l'activation du facteur de migration ANGPTL4 [330], STAT3 activé est un acteur important de la formation des métastases.

La tumorigenèse induit une hypoxie due à l'augmentation rapide du nombre de cellules et à l'énorme demande énergétique que le métabolisme de ces cellules suscite. Ce problème est pallié par l'apparition d'une microcirculation dédiée aux cellules tumorales, née d'une néosynthèse de cellules endothéliales ou d'une transdifférentiation de cellules tumorales en cellules vasculaires. STAT3 participe activement à ce processus de

néoangiogenèse *via* l'activation du facteur de croissance endothélial VEGF, d'Epas1 et de la superoxyde dismutase MnSOD. Le facteur de transcription Epas1 diminue le stress hypoxique en coordonnant le métabolisme cellulaire avec la quantité d'oxygène disponible et favorise l'angiogenèse en activant les protéines nécessaires (VEGF, Flt1, Flt2, Tie2) [331]. STAT3 réduit le stress hypoxique en induisant la production de MnSOD, qui participe à la détoxification des radicaux libres de l'oxygène [332,333].

STAT3 constitutivement actif est donc un acteur de premier plan de la tumorigenèse. Il permet l'échappement de la cellule à tous les processus pouvant réguler la prolifération, favorise l'invasion des cellules tumorales dans d'autres tissus et enfin il participe à la formation d'un environnement adéquat aux cellules tumorales.

Figure 35 : STAT3 favorise la transformation cellulaire et la progression tumorale.



Dans le cytoplasme, STAT3 est recruté au sein des complexes formés par des tyrosines kinases activées (EGFR, récepteur de l'IL-6, Src, BCR-ABL) par les domaines SH2. STAT3 est alors phosphorylé sur Y705, forme un homodimère et est transloqué dans le noyau où il régule l'expression des gènes cibles. La voie STAT3 favorise le processus métastatique en régulant des gènes essentiels pour la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et l'évasion tumorale immunitaire.

Abbreviations: GF, facteur de croissance; JAK, protéine "Janus-activated kinase"; P, tyrosine phosphorylée; Bcl-x<sub>L</sub>, protéine "Bcl-2-like 1"; bFGF, facteur de croissance fibroblastique basique; HIF-1 $\alpha$ , facteur hypoxique inductible 1 $\alpha$ ; RANTES, protéine "regulated upon activation/normal T-cell expressed and secreted"; IP-10, "IFN- $\gamma$ -inducible protein-10".

Réf. : [300] Huang S. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications (2007) Clin Cancer Res. 5 :1362-6.

#### b. STAT3 dans le microenvironnement tumoral.

Lors de la réponse inflammatoire, les vaisseaux sanguins se dilatent afin de permettre l'invasion des cellules immunitaires dans le tissu touché. Or l'inflammation est capable d'induire la transformation oncogénique en générant un microenvironnement favorable à la progression tumorale. Pour exemple, la maladie de Crohn et l'ulcère sont associés à une forte augmentation de l'incidence du cancer du colon [334]. Ce phénomène est marqué par la présence de médiateurs spécifiques produits par les cellules du stroma inflammé, chimiokines et cytokines (IL-6, prostaglandines...) et STAT3 est indispensable à leur régulation, ce qui fait de STAT3 un facteur capable d'induire et de maintenir ce microenvironnement, à la fois au moment de la transformation maligne et pendant la progression tumorale. De plus, le facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB est impliqué dans la carcinogénèse [335,336] et certains facteurs inflammatoires codés par les gènes qu'il module, dont l'IL-6, sont d'importants activateurs de STAT3. NF-κB et STAT3 sont des médiateurs majeurs de l'inflammation protumorale, ce qui s'oppose aux conséquences de l'association fonctionnelle de NF-κB et STAT1, celle-ci stimulant l'immunité [337].

Au delà des fonctions protumorales, la réponse immunitaire et les médiateurs de l'inflammation sont impliqués dans la suppression de la tumorigénèse et de la croissance tumorale [338]; ces fonctions sont inhibées par les STATs, et particulièrement par STAT3 [339]. STAT3 induit l'expression de cytokines, de facteurs angiogéniques et de facteurs de croissance. Les récepteurs de ces molécules activent en retour STAT3, provoquant une boucle de régulation positive entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires [320]. De ce fait, l'activation persistante de STAT3 dans les cellules tumorales peut donc être transmise aux cellules stromales [337]. De plus, l'établissement de cette boucle de régulation de façon stable représente probablement un mécanisme épigénétique indirect : la dérégulation continue de l'expression des gènes sans mutation peut induire des changements dans la méthylation de l'ADN, qui serait alors facilité par STAT3 [340].

En conclusion, beaucoup de cancers humains progressent grâce à des inflammations chroniques. Cependant, l'inflammation et le système immunitaire peuvent inhiber la croissance tumorale voire même éliminer les tumeurs établies. Deux types d'inflammation sont donc distinguables, et les STATs sont des régulateurs centraux de l'inflammation associée au cancer, influençant les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement immunitaire, déterminant *in fine* si l'inflammation favorise ou inhibe le cancer. Par son rôle de pivot dans la détermination de la relation entre l'inflammation et le

cancer, STAT3 est une cible de premier ordre pour amener la réponse inflammatoire protumorale à devenir une réponse immunitaire antitumorale.

## 2. STAT3, une cible thérapeutique.

Les facteurs de transcription oncogéniques représentent des cibles primordiales pour les thérapies anticancéreuses, parce que les voies de signalisation cytoplasmiques, qui utilisent de nombreuses protéines similaires afin d'être redondantes, convergent vers un nombre limité d'effecteurs nucléaires [341]. Le facteur de transcription STAT3 permet un partenariat exclusif entre les cellules malignes et immunitaires, permettant l'évasion immunitaire des tumeurs, la progression tumorale et la résistance aux thérapies.

L'ablation de STAT3 inhibe la carcinogénèse et la croissance de tumeurs établies, mais son absence prolongée induit une autoimmunité [342]. Le blocage total de STAT3 entraînant probablement de sévères pathologies, une inhibition limitée dans le temps peut potentiellement transformer l'inflammation protumorale en réponse immunitaire antitumorale sans générer d'importants effets secondaires [337].

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour inhiber STAT3 : développement de peptides spécifiques [343,344], de petites molécules [332,344,345], d'oligonucléotides [346-348] et utilisation de produits naturels. Cette dernière classe d'inhibiteurs de STAT3 présente un réel potentiel pour la thérapie.

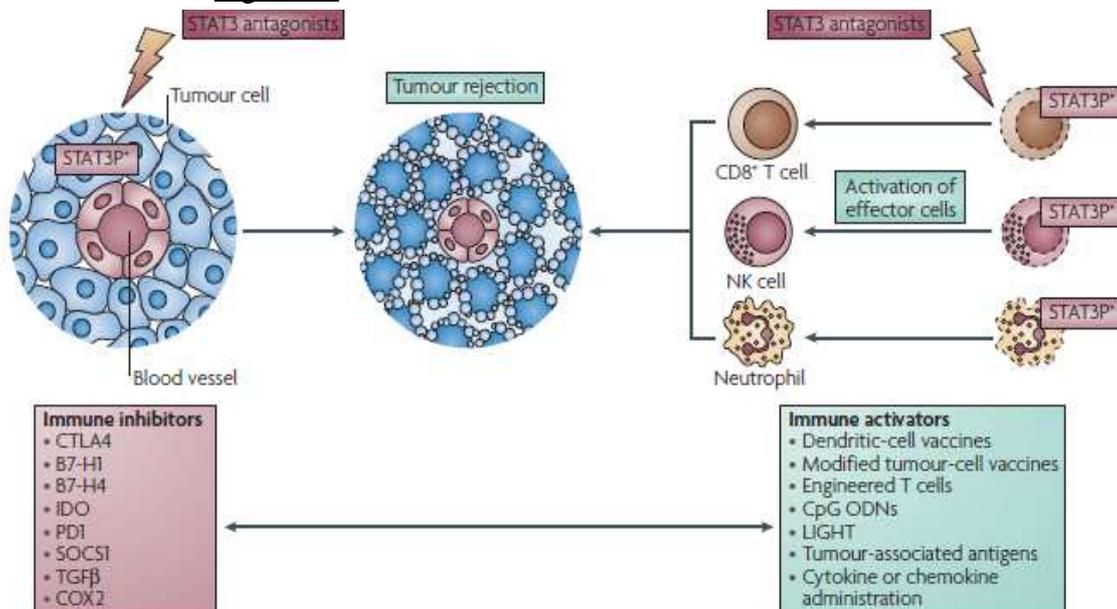
Toutefois, c'est l'utilisation des nombreux produits naturels et leurs dérivés qui inhibent STAT3 qui est la plus avancée, même si leurs effets ne se limitent pas à STAT3. Ces agents naturels sont connus pour leur action chimiopréventive : curcumin, resvératrol, guggulstérone, capsaïcine, flavopiridol en sont quelques exemples [111].

Les mécanismes d'action de ces composés ne sont pas encore tous connus ; le guggulstérone et la capsaïcine stimulent l'expression de SHP, menant à l'inactivation de STAT3, alors que la lutéoline facilite la dégradation de STAT3 dans les hépatocytes [284,349,350].

L'inhibition spécifique de STAT3 est un but majeur des futures thérapeutiques car en plus de ses activités protumorales, STAT3 est lié à la résistance des cellules aux agents thérapeutiques. L'activation de STAT3 favorise la chimiorésistance de cellules [351,352] et est corrélée avec la résistance aux radiations gamma [353]. Cette implication dans la résistance aux chimiothérapies et radiothérapies est complexe car dépendante de nombreux facteurs extracellulaires mais aussi de l'état et la localisation de STAT3 au sein de la cellule.

Associer l'inhibition de STAT3 aux thérapies actuelles devrait permettre d'accroître la durée de vie des traitements actuels. La perturbation du microenvironnement tumoral que régule STAT3 limiterait la formation des métastases et donc l'agressivité des tumeurs (cf. figure 36). Parmi les agents naturels, certains inhibiteurs des kinases JAKs peuvent transformer l'inflammation en réponse antitumorale [354] : l'inhibiteur AZ960 serait un candidat à l'étude clinique [355]. Quelques inhibiteurs des tyrosines kinases ont été acceptés par la FDA (« US Food and Drug Administration ») pour l'utilisation en clinique, dont le sunitinib. Le sunitinib inhibe la voie de signalisation de STAT3 indirectement, provoquant l'arrêt du cycle et l'apoptose dans les cellules, mais peut également moduler le microenvironnement tumoral en faveur de la thérapie anticancéreuse [356-358]. Toutefois, les mécanismes moléculaires exacts concernant l'inhibition de STAT3 restent inconnus.

Figure 36: Intérêt d'un traitement inhibiteur de STAT3.



Le blocage de STAT3 dans diverses cellules immunitaires peut générer une réponse immunitaire antitumorale par diminution de régulateurs négatifs. Une thérapie optimale nécessiterait sûrement l'association avec d'autres traitements, comme les protéines modulatrices de l'activité immunitaire listées (rectangles rouge et bleu).

Abbréviations: COX2, cyclooxygenase2 ; CpG ODNs, oligodeoxynucléotides CpG ; CTLA4, antigène cytotoxique 4 des lymphocytes T ; IDO, indoleamine 2,3-dioxygénase ; LIGHT, "herpesvirus entry mediator ligand" ; PD1, programme de mort cellulaire 1 ; SOCS1, suppresseur de la signalisation des cytokines 1 ; P, tyrosine phosphorylée ; TGFβ : facteur de croissance transformant beta.

**Réf.** : [322] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* (2007) 7 : 41-51.

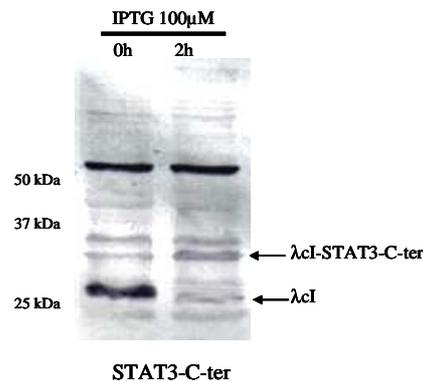
## II. Double hybride de STAT3.

### 1. Faisabilité.

#### a. Production recombinante de la protéine appât STAT3-Cter.

Après production de la biomasse, la production recombinante a été induite avec 100 $\mu$ M d'IPTG pendant 2h à 37°C sous agitation à 225rpm et vérifiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la protéine  $\lambda$ cI. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine STAT3 n'a pas été possible, l'épitope ne se trouvant pas dans la région C-terminale. La protéine  $\lambda$ cI a une masse moléculaire de 27kDa et STAT3-Cter de 7kDa. La protéine recombinante STAT3-C-ter- $\lambda$ cI a donc une masse moléculaire de 34kDa. La protéine est correctement produite par la bactérie ; la première condition nécessaire à la réalisation de double hybride bactérien est remplie.

Figure 37 : STAT3-Cter- $\lambda$ cI est produite par les bactéries du système double hybride.



Western blot à l'aide d'un anticorps anti- $\lambda$ cI de la production recombinante de STAT3-C-ter- $\lambda$ cI.

#### b. Test de « self activation ».

La deuxième condition *sine qua non* de la mise en place du double hybride bactérien est l'absence d'activation du gène rapporteur par la production recombinante de la protéine appât seule. Les bactéries sont cotransformées avec le plasmide recombinant de la protéine appât et le plasmide cible vide et étalées sur milieu sélectif et non sélectif. Après incubation, le pourcentage de clones obtenus sur milieu sélectif par rapport au nombre de clones obtenus sur milieu non sélectif est calculé. Seuls 3 clones ont crû sur milieu sélectif après production de la partie C-terminale de STAT3 (cf.figure 38). Parallèlement, des milliers de clones ont crû sur milieu non sélectif. Il n'y a pas d'activation du gène rapporteur suite à la production

recombinante de STAT3-Cter, le pourcentage de clones sur milieu sélectif par rapport aux clones sur milieu non sélectif étant inférieur à 0,1%.

**Figure 38** : La production des protéines appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.



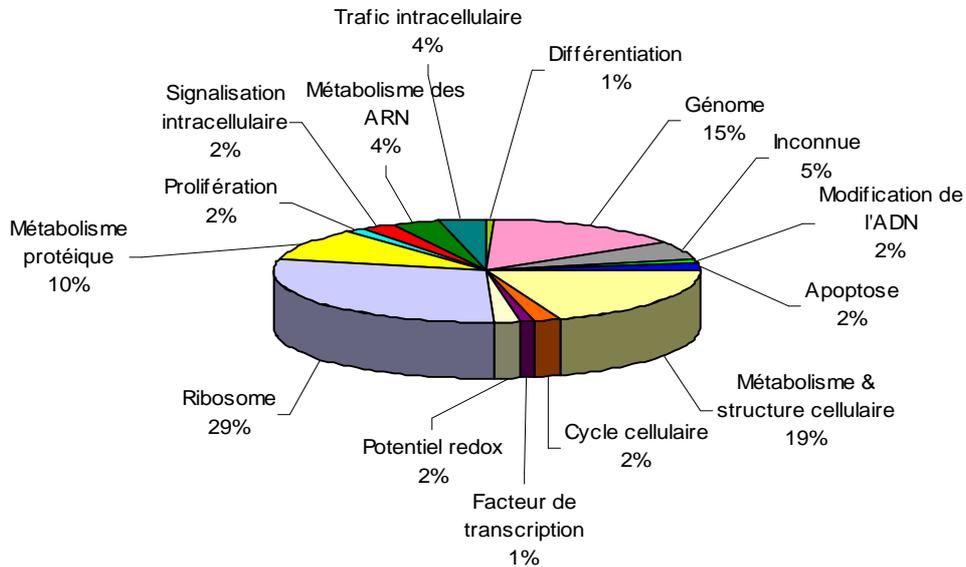
## 2. Crible de la banque par la protéine appât STAT3-Cter.

Le crible d'une partie de la banque d'ADNc par double hybride bactérien a permis d'obtenir 196 clones positifs. Après séquençage, 3 clones comportent des séquences génomiques, 22 des séquences issues du génome mitochondrial et 49 séquences codent des protéines ribosomales. Parmi les 122 clones codant des protéines autres que ribosomales, 14 sont redondants. Après analyse des clones redondants, il apparaît que deux clones contiennent des séquences différentes codant la même protéine ; chaque séquence code une partie de la protéine, et la partie commune aux deux séquences permet de mettre en évidence le domaine d'interaction de cette protéine avec la protéine appât STAT3-C-ter (cf. tableau 3 ci-après).

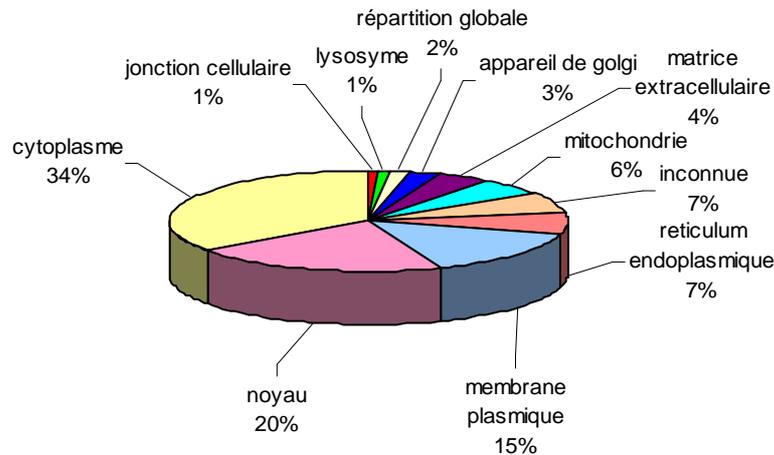
Les clones obtenus ont été classés en fonction de leur nature fonctionnelle (cf. figure 39A). Il s'avère que 15% comportent des séquences génomiques, et plus de la moitié des clones (58%) codent des protéines ribosomales, des protéines liées à la production des protéines *in vivo* ou des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire et l'organisation de la cellule. La majorité des protéines a une localisation cytoplasmique (56%), et parmi celles-ci la majorité est cytosolique (cf. figure 39B).

**Figure 39 :** Répartition des partenaires potentiels de STAT3-Cter obtenus.

**A. Répartition des partenaires en fonction de leur nature fonctionnelle.**



**B. Localisation subcellulaire des partenaires.**

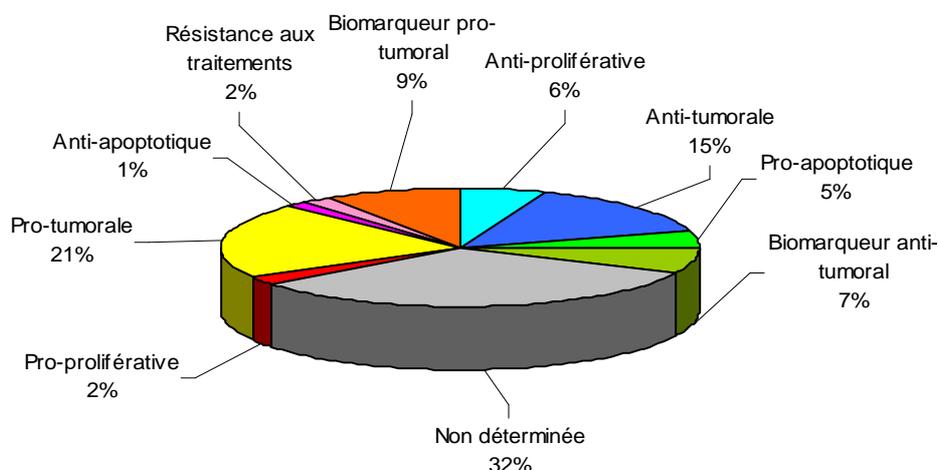


STAT3 est une protéine de signalisation intracellulaire, qui, une fois activée, est capable d'induire la transcription de gènes aux fonctions diverses mais généralement liées à la prolifération cellulaire. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux partenaires de STAT3 interagissant avec le domaine de transactivation de la protéine. Ce domaine, situé en C-terminal, joue un rôle important dans la transcription des gènes cibles. D'après les études actuelles, il est actif uniquement lorsque STAT3 est nucléaire. De ce fait, les protéines issues du criblage ont été classées dans un premier temps en fonction de leur localisation cellulaire.

Les résultats ont été classés dans un second temps selon leur activité durant la progression tumorale. En effet, STAT3 activé est un effecteur particulièrement important de la progression tumorale en stimulant les voies de prolifération et de migration tout en inhibant

les voies de mort cellulaire. En outre, les différentes protéines mises en évidence appartiennent à des groupes fonctionnels très différents. Du fait de cette hétérogénéité, il est difficile de grouper les partenaires potentiels selon des familles fonctionnelles. La figure 40 ci-dessous donne un aperçu des types de partenaires potentiels obtenus selon leur activité dans les processus cancéreux ; l'effet tumoral d'une protéine regroupe ici à la fois un effet sur la prolifération, sur la migration cellulaire et sur l'apoptose.

**Figure 40** : Répartition des partenaires potentiels de STAT3-Cter obtenus en fonction de leur activité cancéreuses (hypothétique ou démontrée).



Le tableau 3 ci-après définit pour chaque partenaire les activités tumorales décrites dans la littérature, lorsque cela est possible. Lorsque c'est le cas, la présence de redondance est indiquée par le nombre de clones trouvés. Dans la littérature existante à ce jour, 25 candidats ne présentent d'activité particulière au cours des processus tumoraux. Pour certains d'entre eux, aucune fonction n'a même été mise en évidence dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Certaines protéines ne possèdent apparemment d'activité particulière dans la progression tumorale mais une modulation de leur expression est régulièrement trouvée dans diverses études ; ces protéines sont définies ici comme des biomarqueurs. Le terme biomarqueur désigne une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non. Il est une signature biologique de l'effet et non la mise en évidence directe de la cause. Les biomarqueurs peuvent aussi révéler un évènement passé. De ce fait, un biomarqueur n'est pas uniquement une protéine mesurable de manière simple utilisable pour la recherche clinique comme le sont la gonadotrophine chorionique humaine, marqueur de la grossesse, et l'antigène prostatique spécifique (PSA), marqueur du cancer de la prostate.

Tableau 3 : Partenaires potentiels d'interaction avec le domaine de transactivation de STAT3.

Nom	N° Uniprot	Fonction/Implication dans les processus cancéreux	Référence(s)
<b>Protéines nucléaires et Protéines cytoplasmiques et nucléaires</b>			
<i><b>Facteurs de transcription / Protéines liées à l'ADN</b></i>			
ATF4 : "activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)"	P18848	Facteur de transcription bZIP. Transcription de gènes du métabolisme des acides aminés, de la différenciation, du processus métastatique, de la survie sous hypoxie et de l'angiogenèse. Induit par le microenvironnement tumoral, régule la progression tumorale. Taux élevé associé à une résistance aux agents induisant des dommages sur l'ADN, aux anti-inflammatoires non stéroïdiens et aux inhibiteurs du protéasome	[359-362]
DDB2 : "damage-specific DNA binding protein 2"	Q92466	Protéine de réparation de l'ADN. Régule le taux de p21 et de SOD2. Active après dommages sur l'ADN	[363-365]
MPG : "N-methylpurine-DNA glycosylase"	P29372	Augmenterait la sensibilité aux agents thérapeutiques. Expression altérée dans les tumeurs	[366,367]
USF1 : "upstream transcription factor 1"	P22415	2 clones identiques codant les aa 137 à 243 sur 251 aa totaux. Facteur de transcription. Voie de Src. Active le gène suppresseur de tumeur APC	[368-370]
<i><b>Prolifération / Apoptose / Régulation des voies de signalisation</b></i>			
ANXA1 : "annexin A1"	P04083	Fonctions dans les voies inflammatoires, régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire, dans la carcinogenèse.	[371]
CDKN1A (p21) : "cyclin-dependent kinase inhibitor 1A"	P38936	3 clones identiques. Régulateur négatif du cycle cellulaire. Interagit avec STAT3	[280]
DUSP23 (LDP3) : "dual specificity phosphatase 23"	Q9BVJ7	Phosphatase (tyrosine et sérine/thréonine). Favorise l'activation de JNK et p38 suite à un stress osmotique.	[372,373]
EEF1A1 : "eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1"	P68104	Son interaction avec C-Raf augmente sa stabilité et induit la survie. Impliqué dans la mort cellulaire indépendante des caspases.	[374-378]

IMUP : "immortalization-upregulated protein 1"	Q9GZP8	Rôle dans l'acquisition du phénotype transformant, dans la tumorigenèse et dans la prolifération cellulaire.	[379-382]
LGALS3 (galectin 3) : "lectin, galactoside-binding, soluble, 3"	P17931	Adhésion des cellules tumorales, prolifération, différenciation, angiogenèse, progression du cancer et des métastases. Supprime l'apoptose induite par les drogues. Régule l'expression des gènes cyclineD1, TTF1 et MUC2, associés à la progression tumorale.	[383,384]
NEDD8 : "neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8"	Q15843	Contrôle du cycle cellulaire et Protéolyse	[385]
NPDC1 : "neural proliferation, differentiation and control, 1"	Q9NQX5	Suppresseur de tumeur. Interagit avec E2F-1 et module son activité transcriptionnelle. Interagit avec cycline D et cdk2.	[386,387]
NUTF2 : "nuclear transport factor 2"	P61970	Import des Smads et de l'oncogène Ras dans le noyau.	[388,389]
RNPS1 : "RNA binding protein S1, serine-rich domain"	Q15287	Antitumoral : réduit la prolifération et l'invasion à travers la matrice	[390]
S100A6 (calcylin) : "S100 calcium binding protein A6"	P06703	2 clones identiques. Prolifération cellulaire et tumorigenèse. Interagit avec p53.	[391-393].
SFN : "stratifin"	P31947	Protéine 14.3.3. Stimule la voie Akt/mTOR. Arrêt du cycle cellulaire. Export nucléaire et dégradation DeltaNp63alpha. Favorise l'activité de la PKC.	[394-397]
<b><i>Migration / Métastases</i></b>			
DGCR6 : "DiGeorge syndrome critical region gene 6"	Q14129	Médiateur possible de l'invasion	[398]
KLK6 (neurosin) : "kallikrein-related peptidase 6"	Q92876	Sérine protéase. Invasion et métastase. Biomarqueur	[399-401]
<b><i>Biomarqueur / Protéines dont la modulation de l'expression est associée aux processus cancéreux</i></b>			
EEF1G : "eukaryotic translation elongation factor 1 gamma"	P26641	Biomarqueur potentiel	[402]

**Protéines cytoplasmiques et Protéines des organelles**

***Prolifération / Apoptose / Régulation des voies de signalisation***

AKT1S1 (PRAS40) : "AKT1 substrate 1 (proline-rich)"	Q96B36	Activation constitutive par PI3/Akt dans les cellules tumorales du sein, évènement précoce de la carcinogenèse pulmonaire et mammaire. Contrôle la balance entre la croissance et la mort cellulaire, dérégule l'apoptose pour favoriser la tumorigenèse. Appartient au complexe mTORC1.	[403-406]
ALDH3A1 : "aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1"	Q6PKA6	Protection contre l'arrêt de la croissance cellulaire due à la peroxydation des membranes. Taux élevé associé à la transformation de cellules pulmonaires en adénocarcinome	[407,408]
APH1A : "anterior pharynx defective 1A, gamma-secretase subunit"	Q96BI3	Clivage du récepteur Notch ou de la beta-amyloïde. Déclenche une réponse anti-apoptotique en dévaluant le contrôle de la caspase 3 dépendant de p53	[409,410]
BTG3 : "BTG family, member 3"	Q14201	Régulation négative du cycle cellulaire. Cible transcriptionnelle de p53. Inhiber E2F1. Inhibition la voie de signalisation dépendante de Src.	[411-413]
CTSD : "cathepsin D"	P07339	Protéase acide impliquée dans la protéolyse et la mort cellulaire. Protège contre l'apoptose. Activité dépendante du microenvironnement tumoral	[414-416]
DGUOK : "deoxyguanosine kinase"	Q16854	Phosphoryle certains analogues de déoxyribonucléosides utilisés comme agents thérapeutiques.	[417]
GAPDH : "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase"	P04406	Apoptose neuronale induite par p53. Induit la perméabilisation mitochondriale apoptotique.	[418-420]
GPX1 : "glutathione peroxidase 1"	P07203	Protection contre les UV, anti-apoptotique, inhibition de l'activité des caspases, régulation de la prolifération, relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Biomarqueur risque du cancer colorectal. Protection contre le stress oxydatif	[421-426]
GRN : "granulin"	P28799	Sécrétée. Inflammation, Réparation et Remodelage des tissus. Stimule la migration et l'invasion. Activation de la voie ERK1/2. Stimule croissance, migration et affranchissement d'un support pour la croissance cellulaire. Son précurseur est important dans la progression tumorale et dans la réponse aux drogues chimiques. Marqueur pronostic dans les carcinomes ovariens.	[427-430]

GSTP1 : "glutathione S-transferase pi"	P09211	2 clones identiques. Suppression de l'expression protéique dans la majorité des cas de néoplasie intraépithéliale de faible pronostic. Réduit la prolifération cellulaire et protège les cellules contre l'apoptose via la kinase JNK. Cible transcriptionnelle de p53.	[431-433]
MTCH1 ou PSAP : "mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)" ou "presenilin associated protein"	Q9NZJ7	Déperméabilisation de la membrane mitochondriale. Apoptose	[434,435]
PPIA (cyclophilin A) : "peptidylprolyl isomerase A"	P62937	Activité pro-tumorale. Activation et localisation de STAT3. Surexprimée, active la voie de signalisation ERK. Ligand pour la production de métalloprotéases matricielles.	[436-438]
PRDX1 : "peroxiredoxin 1"	Q06830	Suppresseur de tumeur en réponse aux stress oxydatifs. Interagit avec les oncogènes c-abl et c-myc. Prolifération et apoptose	[439,440]
PRDX2 : "peroxiredoxin 2"	P32119	Suppresseur de tumeur. Sénescence. Inhibe l'apoptose induite par p53 . Réprimé par le resvératrol	[440-443]
TMSB4X : "thymosin beta 4, X-linked"	P62328	2 clones identiques. Augmente l'expression de cytokines, active JNK. Induit les métastases et la résistance au paclitaxel. Favorise l'activité des caspases et de Bcl2	[444,445]
<b><i>Migration / Métastases</i></b>			
CHCHD2 : "coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2"	Q9Y6H1	2 clones identiques. Induit la migration cellulaire associée au renforcement des plaques d'adhésion focales et des fibres d'actine.	[446,447]
KRT18 : "keratin 18"	Q969I0	Cible de la voie Ras. Protection par Il-6. Apoptose. Sa surexpression réduit la prolifération tumorale.	[448-450]
KRT8 : "keratin 8"	P05787	4 clones identiques. Invasion et métastases. Dégradée par les caspases. Coexprimée avec KRT18 dans les cellules au phénotype de résistance multiple aux drogues anticancéreuses.	[451-453]
SQSTM1 : "sequestosome 1"	Q13501	Autophagie. Activation de NF-κB. Atténue l'expression des cytokines.	[454-457]

<b><i>Implication dans la résistance aux traitements</i></b>			
COX7C : "cytochrome c oxidase subunit VIIc"	P15954	Expression augmentée dans cancer cutané squameux. Implication dans la résistance au 5FU.	[458,459]
MGST1: "microsomal glutathione S-transferase 1"	P10620	Activé par le stress oxydatif. Induit le relargage du cytochrome c. Résistance multiple aux drogues	[460,461]
<b><i>Biomarqueur / Protéines dont la modulation de l'expression est associée aux processus cancéreux</i></b>			
ATAD4 : "ATPase family, AAA domain containing 4"	Q9BU68	Biomarqueur potentiel	[462]
C3orf10 (HSPC300) : "chromosome 3 open reading frame 10"	Q8WUW1	Progression tumorale dans le cancer du rein. Surexpression dans le poumon	[463,464]
FTH1 : "ferritin, heavy polypeptide 1"	P02794	Expression réprimée après transformation des cellules par l'oncogène Ras. La surexpression réduit l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène en réponse à des dommages oxydatifs cellulaires	[465,466]o
FTL : "ferritin, light polypeptide"	P02792	2 clones identiques. Expression réprimée après transformation des cellules par l'oncogène Ras. La surexpression réduit l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène en réponse à des dommages oxydatifs cellulaires. Biomarqueur pronostic dans le cancer du sein	[465-467]u
HM13 : "histocompatibility (minor) 13"	Q8TCT9	Modulé en réponse aux androgènes. Biomarqueur	[468]
KIF3A : "kinesin family member 3A"	Q9Y496	La surexpression peut être associée au phénotype métastatique	[469]
OAZ1 : "ornithine decarboxylase antizyme 1"	P54368	Augmentée sous traitement anticancéreux	[470]
PSMD3 : "proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase"	O43242	Sous-unité du protéasome 26S. Biomarqueur	[471]

UBA52 : "ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1"	Q3MIH3	3 clones identiques. Biomarqueur potentiel	[472,473]
<b>Protéines cytoplasmiques et membranaires</b>			
<b><i>Prolifération / Apoptose / Régulation des voies de signalisation</i></b>			
GNB2L1 (RACK1) : "guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1"	P63244	2 clones codant des régions différentes : aa 105-318 et aa 1-274 sur 318 aa totaux. Implication dans l'activation de STAT1. Influence de la tumorigenèse des cellules de mélanome.	[474,475]
PRELP : "proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein"	P51888	Interaction avec NF-kappaB, inhibe sa liaison à l'ADN	[476]
<b><i>Migration / Métastases</i></b>			
CTNNA1 : "catenin (cadherin- associated protein), alpha 1"	P35221	Protéine suppresseur de l'invasion tumorale	[477,478]
<b><i>Implication dans la résistance aux traitements</i></b>			
ABCC9 : "ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9"	O60706	Sous-unité des canaux potassiques sensibles à l'ATP, pourrait être impliquée dans la résistance aux traitements	[479,480]
ABCD1 : "ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1"	P33897	La diminution du taux d'expression pourrait être impliquée dans la tumorigenèse rénale. Les transporteurs de type ABC seraient associés avec la résistance des cellules de mélanome à divers drogues thérapeutiques.	[481]
ATP1B1 : "ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide"	P05026	2 clones identiques. Expression différentielle dans les cancers du sein et ovariens. Réduction de l'expression associée à la résistance à l'oxaliplatine.	[482-484]
<b><i>Biomarqueur / Protéines dont la modulation de l'expression est associée aux processus cancéreux</i></b>			
MARCKSL1 : "myristoylated alanine-rich C kinase substrate- like 1"	P49006	2 clones identiques. La surexpression diminue la prolifération. Biomarqueur	[485-487]

SLC12A2 : "solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2"	P55011	Biomarqueur potentiel	[488]
<b>Protéines sécrétées</b>			
CST3 : "cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)"	P01034	Favorise l'invasion tumorale en modulant l'activité de la cascade MAPK/Erk. Inhibiteur de cystéine protéase. La surexpression antagonise l'invasion. Antagoniste du récepteur du TGFβ. Réprimé dans 50% des cancers.	[489,490]
SOD3 : "superoxide dismutase 3, extracellular"	P08294	Protection contre les stress oxydatifs. Inhibe prolifération et invasion cellulaire.	[491,492]
TNFSF9 : "tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9"	P41273	Cytokine. Interaction entre cellules dendritiques et tumeurs. Active JNK. Voie utilisable en thérapeutique.	[493-497]
<b>Protéines dont les fonctions dans les processus cancéreux sont inconnues</b>			
"EP400 N-terminal like"	Q6ZTU2	Pas d'informations	-
AP2S1 : "adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit" (AP17, CLAPS2)	P53680	Pas d'informations directes. Phosphorylation de la sous-unité beta2-adaptin du complexe AP-2 par l'oncogène c-Src	[498]
AP3S2 : "adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit"	P59780	Pas d'informations.	-
ATP5G3 : "ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9)"	P48201	2 clones identiques. Pas d'informations.	-
BET1L : "blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)-like"	Q9NYM9	15 clones identiques. Pas d'informations	-
C20orf4 : "chromosome 20 open reading frame 4"	Q9Y312	Pas d'informations	-

C7orf49 : "chromosome 7 open reading frame 49"	Q9BWK5	Pas d'informations	-
CDC42EP5 : "CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5"	Q6NZY7	Pas d'informations	-
DPM2 : "dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit"	O94777	Pas d'informations	-
EIF3D : "eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D"	O15371	Pas d'informations	-
ENTPD6 : "ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative function)"	O75354	Pas d'informations	-
FAM54B : "family with sequence similarity 54, member B"	Q9H019	Pas d'informations	-
GEMIN7 : "gem (nuclear organelle) associated protein 7"	Q9H840	Pas d'informations	-
GIYD1 (SLX1) : "GIY-YIG domain containing 1"	Q9BQ83	2 clones identiques. Pas d'informations	-
IDH3G : "isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma"	P51553	3 clones identiques. Pas d'informations	-
JMJD4 : "jumonji domain containing 4"	Q9H9V9	Pas d'informations	-
MICALL1 : "MICAL-like 1"	Q8N3F8	Pas d'informations	-

NELF : "nasal embryonic LHRH factor"	Q6X4W1	Pas d'informations	-
OS9 : "amplified in osteosarcoma"	Q13438	Pas d'informations	-
PLAC8 : "placenta-specific 8"	Q9NZF1	Pas d'informations	-
PNPLA7 : "patatin-like phospholipase domain containing 7"	Q6ZV29	Pas d'informations	-
SAKS1 : "SAPK substrate protein 1" (LOC51035)	Q04323	Pas d'informations	-
SERF2 : "small EDRK-rich factor 2"	P84101	Pas d'informations	-
TMED10 : "transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)"	P49755	Pas d'informations	-
WIBG : "within bgcn homolog (Drosophila)"	Q9BRP8	Pas d'informations	-
WSB2 : "WD repeat and SOCS box-containing 2"	Q9NYS7	Pas d'informations	-
YWHAQ : "tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide"	Q53RR5	Pas d'informations	-
ZKSCAN5 : "zinc finger with KRAB and SCAN domains 5"	Q9Y2L8	Pas d'informations	-

### III. Discussion et conclusion.

La protéine appât utilisée dans ce double hybride est constituée de la partie C-terminale de STAT3, ou domaine de transactivation. Ce domaine est composé des aa 715 à 770 et contient donc le résidu sérine 727 qui peut être phosphorylé quand STAT3 est nucléaire. Comme il a été vu précédemment, le domaine de transactivation est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de STAT3. Le but de cette étude a été de mettre en évidence de nouveaux partenaires d'interaction de STAT3 qui modulerait la transcription de ses gènes cibles. Le domaine de transactivation permet le recrutement de protéines coeffectrices au niveau du promoteur du gène cible. Quelques coactivateurs ont déjà été démontré : SRC1A, CBP et p300 sont recrutés par interaction avec ce domaine afin d'acétyler les histones [285]. Cette modification des histones induit leur déplacement le long de la chromatine, associée au remodelage de la chromatine par le complexe BRG/BRM ; BRG est d'ailleurs une autre protéine recrutée par interaction avec STAT3 [286].

Le double hybride a été réalisé à partir d'une banque d'ADNc issue des transcrits de la lignée cellulaire cancéreuse colorectale LS180. Nous avons mis en évidence près d'une centaine de nouvelles protéines interagissant avec le domaine de transactivation de STAT3. Toutefois, ces interactions ont été mises en évidence dans un modèle bactérien, ce qui ne permet pas de conclure sur l'existence de ces complexes *in vivo* mais d'obtenir une liste de candidats potentiels.

Les candidats appartiennent à des familles de protéines très hétérogènes et ont pour la plupart des actions pleiotropes dans les processus cancéreux. Ces résultats sont en adéquation avec l'importante diversité des fonctions de STAT3 dans les cellules cancéreuses. La présence de nombreuses protéines ribosomales est très probablement due à la biosynthèse de STAT3, qui nécessite la liaison avec les ribosomes. Ces protéines, retrouvées au cours du double hybride, ne sont pas considérées comme des candidats potentiels. Toutefois, certaines possèdent des fonctions tumorales : de nombreuses protéines ribosomales, par exemple RPL18, RPL13 et RPS2, sont des biomarqueurs cellulaires de prolifération tumorale [499-501] Par contre, RPL29 n'est pas un biomarqueur mais participe à la différenciation des cellules colorectales [502].

De plus, parmi les candidats, de nombreuses protéines sont localisées dans le cytoplasme. Une partie de ces protéines participent au trafic intracellulaire (protéines du réticulum endoplasmique, du Golgi, du cytosquelette), et ne sont probablement pas engagées dans une interaction spécifique avec STAT3. De même, l'interaction de STAT3, qui plus est

le domaine de transactivation, avec des protéines du métabolisme ou de la structure cellulaire semble être non spécifique ou sans intérêt. Pourtant, beaucoup possèdent des fonctions tumorales liées aux effets oncogéniques de STAT3 (cf. tableau 3). Les exemples de la GAPDH et de GNB2L1 sont décrits ci-après.

La glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) participe au trafic intracellulaire par son activité glycolytique durant le processus de la voie sécrétoire et serait impliquée dans l'apoptose neuronale induite par p53 qui stimule son expression [418,419,503]. De plus, elle peut s'accumuler dans la mitochondrie pour induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale durant l'apoptose [420]. Or, STAT3 régulerait l'homéostasie de la mitochondrie afin de faciliter la transformation cellulaire [325]. Il est possible que STAT3 activé dans la mitochondrie interagisse avec GAPDH afin de protéger les cellules contre l'apoptose. Cette hypothèse sous-entend un nouveau rôle pour le domaine C-ter de STAT3, mais aucune étude à l'heure actuelle ne le laisse supposer.

GNB2L1, ou RACK1, est une protéine membranaire qui permettrait l'ancrage de la protéine kinase C activée au cytosquelette. RACK1 supprime l'activité de Src, ce qui inhibe également STAT3 et Myc ; par conséquent la cycline D1, cdk2 et cdk4 sont réprimés, p27 et Rb sont activés, E2F1 est séquestré et le cycle est bloqué au niveau de la transition entre la phase G1 et la phase S [504]. Parallèlement, deux études montrent l'implication de RACK1 dans l'activation de STAT1 et sa liaison avec les récepteurs membranaires [474,475]. Bien que les auteurs suggèrent une interaction de cette protéine avec d'autres STATs, l'implication du domaine C-terminal reste incertaine.

Les interactions cytoplasmiques de STAT3-C-ter ne sont pas décrites dans la littérature ; de ce fait les partenaires cytoplasmiques mis en évidence dans cette étude ne sont pas des candidats primordiaux à une analyse plus poussée. Néanmoins, le cas de la protéine AKT1S1 (ou PRAS40) et de BTG3 semblent intéressants.

PRAS40 est une sous-unité du complexe mTORC1 ("mammalian target of rapamycin complex 1 »), qui régule la croissance cellulaire et la survie en réponse aux signaux nutritifs et hormonaux. Elle est activée constitutivement par la voie de signalisation PI3K/Akt dans les cellules malignes et pré-malignes du sein alors qu'il est très peu exprimé dans les cellules normales [406]. Elle contrôle la balance entre la croissance et la mort cellulaire et dérégule l'apoptose pour favoriser la tumorigenèse, ce qui en fait une cible potentielle des thérapies anticancéreuses [403,405]. Le complexe mTORC1 activé régule positivement la synthèse de régulateurs clés de la synthèse des ribosomes et de la traduction des ARN messagers. PRAS40 est impliqué dans la régulation négative de la voie TOR et de l'activité kinase, dans la

régulation de la taille des cellules et de la production des gènes de survie. Il fonctionne comme un régulateur négatif lorsqu'il est lié à mTORC1 et s'en dissocie en réponse à l'insuline [404]. Or, Kim *et al.* a montré que STAT3 était impliqué dans la résistance à l'insuline dans les cellules hépatiques provoquée par un excès d'acides aminés ou inhibée par la rapamycine. Cette fonction serait dépendante de la phosphorylation de S727 et indépendante de celle de Y705, phosphorylation induite par mTOR en réponse à l'excès d'acides aminés [505]. De plus, mTOR régule positivement l'invasion des trophoblastes en stimulant la sécrétion d'enzymes qui modifie la matrice extracellulaire et l'inhibition de mTOR induit une diminution de la phosphorylation de S727 [506]. Selon ces études, bien que cytoplasmique, PRAS40 pourrait interagir avec STAT3 : en présence d'excès d'acides aminés, PRAS40 lié à mTORC1 inhiberait la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3, ce qui provoquerait la résistance des cellules à l'insuline.

BTG3 (« B-cell translocation gene ») est une protéine cytoplasmique impliquée dans la régulation négative du cycle cellulaire. Sa surexpression bloque la progression du cycle induite par le sérum au niveau de la phase G1 du cycle. Cloné en 1997 [507], BTG3 est une cible transcriptionnelle de p53 capable d'inhiber E2F1 [411]. Les travaux des équipes de Yu et de Majid dans les cellules du sein ont permis de définir BTG3 comme un suppresseur de tumeur sensible au genistein [412,413]. BTG3 est également impliqué dans l'inhibition la voie de signalisation dépendante de Src [413]. STAT3 est activé par phosphorylation sur Y705 par Src et est un acteur du pouvoir transformant de v-src [307-310]. La liaison entre STAT3 et BTG3 pourrait participer à l'activité oncogénique de Src : STAT3 séquestrerait BTG3 afin de favoriser la transformation par Src. Dans ce cas, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une nouvelle fonction cytoplasmique du domaine de transactivation de STAT3, qui serait indépendant de la phosphorylation de S727 et dépendant de la phosphorylation de Y705.

Les protéines nucléaires ou pouvant être localisée dans le cytoplasme et dans le noyau représentent des candidats à une étude approfondie de l'interaction. Parmi celles-ci, certaines présentent un intérêt particulier : ATF4, DDB2 et USF1.

L'un des candidats qui semble être prometteur pour la poursuite de l'étude de l'interaction est ATF4. Facteur de transcription de type bZIP ("basic leucine zipper") comme c-fos et c-jun, il régule la transcription de gènes impliqués entre autres dans le métabolisme des acides aminés, dans le processus métastatique, dans la survie sous hypoxie et dans l'angiogénèse. ATF4 est induit par le microenvironnement tumoral et régule la progression tumorale, ce qui en fait une cible pour les thérapies anticancéreuses [361,362]. Le réticulum

endoplasmique est très sensible à l'hypoxie, qui favorise l'agressivité des tumeurs et a un impact négatif sur la réponse aux thérapies. L'hypoxie résulte en l'accumulation de protéines mal repliées induisant une réponse modifiée dite UPR (« Unfold Protein Response ») dont ATF4 est un régulateur majeur. Le stress du réticulum endoplasmique est un inducteur de l'autophagie *via* l'activité et la stabilisation d'ATF4. ATF4 est associé aux résistances des cellules au cisplatine [508], aux agents induisant des dommages sur l'ADN, aux anti-inflammatoires non stéroïdiens et aux inhibiteurs du protéasome [360,362]. Bagheri *et al.* a mis en évidence un lien entre ATF4 et la localisation de STAT3 dans le développement des glandes mammaires chez les souris surexprimant ATF4. La surexpression détériore sévèrement le développement des glandes mammaires, associé à une réduction de la prolifération et une différenciation de l'épithélium alvéolaire mammaire et la surexpression de p21 et p27. De plus, ces cellules glandulaires mammaires présentent une translocation nucléaire de STAT3 activé [359]. La probabilité d'une interaction entre STAT3 et ATF4, deux facteurs de transcription dont les activités protumorales sont similaires, est élevée.

L'annihilation d'ATF4 induit une répression de la transcription des gènes du métabolisme du glutathion. ATF4 jouerait un rôle dans la résistance multiple aux drogues *via* le système redox dépendant du glutathion [509]. Or, il est intéressant de noter que deux enzymes de ce métabolisme ont été retrouvées : GPX1 et GSTP1, impliquées dans la préservation des cellules face aux stress oxydatifs. Ces travaux permettent de renforcer l'idée d'une action synergique entre STAT3 et ATF4.

Un second facteur de transcription a été mis en évidence. USF1 se lie à une séquence d'ADN symétrique (E-box) présente dans divers promoteurs viraux et cellulaires. Activé par la voie de signalisation MEK/ERK [368], USF1 active le gène suppresseur de tumeur APC [370] et est lié à la répression du suppresseur de tumeur SSeCKS suite aux changements dans la chromatine du promoteur due à l'oncogène Src [369]. USF1 se présente donc comme un facteur de transcription anti-tumoral ; il est donc envisageable que l'interaction avec STAT3 existe *in vivo* et qu'elle permette l'inhibition de la transcription des gènes cibles d'USF1, notamment suite à la transformation cellulaire par Src.

Le dernier candidat dont la probabilité d'interaction est élevée est DDB2. DDB2 est une protéine de réparation de l'ADN activée suite à des dommages sur l'ADN, notamment par les UV. Elle active le système de réparation par excision de nucléotides en régulant le taux de p21waf1 et celui de p53, ce dernier régulant en retour l'expression de DDB2 [363,364]. De plus, DDB2 possède une activité E3 ligase, permettant l'ubiquitination des histones H2, H3 et H4 afin de faciliter la réparation de l'ADN. Enfin, DDB2 peut activer le programme de mort

cellulaire par cette activité ligase [510]. Parallèlement, l'implication de STAT3 dans ces processus a été amorcée par Vigneron *et al.* : STAT3 prévient l'activation de l'endonucléase Eme-1, limitant les dommages sur l'ADN et augmentant la survie cellulaire [323]. L'existence de l'interaction entre DDB2 et STAT3 a été vérifiée par coimmunoprécipitation dans les cellules cancéreuses colorectales par l'équipe de recherche du centre Paul Papin d'Angers.

La recherche dans les principales banques de données végétales par comparaison de séquences protéiques n'a pas permis de mettre en évidence des orthologues de STAT3 dans les principaux modèles tels qu'*Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*. Cependant, trois protéines similaires possédant un domaine SH2 ont été découvertes : AtSHA et AtSHB chez *Arabidopsis thaliana* et OsSHA chez le riz (*Oryza sativa*) [511,512]. Gao *et al.* a réalisé un alignement des protéines végétales similaires aux STATs humains par leur domaine SH2 : ces protéines sont issues du soja (*Glycine max*, BE657344), du riz (*Oryza sativa*, AC087599), du pois (*Triticum aestivum*, BJ255035), du maïs (*Zea mays*, BH788331) et de la légumineuse *Medicago truncatula* (BG583569) [511]. Pourtant leurs fonctions restent inconnues et il n'a pas été détecté de domaine de liaison à l'ADN.

Cette étude chez l'Homme peut permettre d'appréhender les fonctions de ces protéines chez les plantes. En effet, le complexe TOR possède des orthologues chez les plantes et participe à l'autophagie [513]. DDB2 possède un orthologue chez *Arabidopsis thaliana*, AtUV-DDB2, qui participe à la réparation de l'ADN mais influence aussi la prolifération cellulaire dans le méristème [514,515]. Chez *Medicago truncatula*, la comparaison d'AtUV-DDB2 avec la banque de données NCBI a donné une correspondance faible avec une protéine référencée sous le numéro d'accèsion ACJ85065 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>).

En conclusion, cette étude ouvre de réelles perspectives d'études tant en recherche animale que végétale. STAT3 est une protéine aux fonctions pleiotropes dont certains domaines sont conservés entre les espèces. Son activation est sensible à différents stress dont l'hypoxie. Bien que certaines interactions semblent plus probables que d'autres, il sera intéressant de vérifier dans un premier temps les interactions de STAT3 avec les protéines de stress mises en évidence dans cette étude chez l'Homme afin dans un second temps d'appréhender l'existence de celles-ci chez les plantes. Cette étude a permis de trouver plusieurs protéines impliquées dans les stress hypoxiques (PRDX1, PRDX2, GPX1, ATF4 par exemple). L'interaction entre MtSAP1 et STAT3 reste encre à démontrer mais ces résultats nous permettent d'envisager un lien entre STAT3 et les stress hypoxiques, et donc entre la protéine de stress SAP et STAT3, chez l'Homme et chez *Medicago truncatula*.

## **Partie 2 : Double hybride de p21.**

### **I. p21, un inhibiteur du cycle cellulaire aux rôles multiples.**

#### 1. Le gène et la protéine.

Le gène *CDKN1A* pour « cyclin-dependent kinase inhibitor 1A » a été mis en évidence suite à une approche par hybridation soustractive et suppressive des fonctions du gène suppresseur de tumeur p53. L'induction du gène (identifié comme le gène *waf1*) est associée à l'expression du gène p53 sauvage mais pas à celle du mutant dans une lignée cellulaire tumorale cérébrale humaine [516]. Le gène *CDKN1A*, polymorphique, est localisé chez l'Homme en 6p21.2 [517] et est référencé dans la base de données NCBI sous l'identifiant NM\_078467 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Des orthologues très proches existent chez les rongeurs (n° accès uniprot souris P39689 et rat Q64315) dont la séquence, la structure et l'activation par p53 sont conservées [516] (cf. figure 41A). Chez les végétaux, il existe un orthologue chez *Arabidopsis thaliana*, KRP4 (n° d'accès uniprot Q8GYJ3), et un chez le riz (KRP4, n° d'accès uniprot Q7XDH8) (cf. figure 41B). Toutefois aucune séquence similaire n'a été mise en évidence chez *Medicago truncatula*. *CDKN1A* code une petite protéine de 165 acides aminés référencée dans la base de données Uniprot sous l'identifiant P38936 (<http://www.uniprot.org/>). De nombreux noms lui ont été attribués : p21, CAP20, CDKN1, CIP1, MDA6, PIC1, SDI1, WAF1. Tout au long de ce travail, le gène est nommé *CDKN1A* et la protéine p21. La séquence primaire est présentée sur la figure 42. p21 est exprimée ubiquitairement dans les cellules de mammifères [518,519] et dans tous les tissus humains. La protéine est finement régulée et instable : elle a une demi-vie de 20 à 60 minutes seulement.

**Figure 41** : Alignement des séquences primaires des orthologues de p21

**A. Comparaison entre p21 chez l'Homme et chez les rongeurs.**

```

Hs : MSEPAQDVRQNEPCGSKACRRFLFGPVDSEQLSRDCDALMAGCTIQEAREERWNEFV/TETPLEGDFAMERVRSLGLPKLYLPTGRRGRDE : 88
Mm : MSNPEGDVRFVPHRSKVCRCFLFGPVDSEQLRRDCDALMAGCTIQEAREERWNEFV/TETPLEGNFVWERVRSGLPKVYLSFGSRS--RDD : 86
Rn : MSDEPGDVRFPVPHRSKVCRRFLFGPVDSEQLSRDCDALMAGCTIQEAREERWNEFV/TETPLEGNVWERVRSGLPKLYLSFGSRS--RDD : 86
MS P GDVRpvPhrSKVCRrLFGPVDSEQLsRDCDALMagC6QEAREERWNEFVtETPLEG15vWERVRS1GLPK6YlSpGsrRr Rdd

Hs : LGGRRRPFSTSSALLQG--TAEEDHVDLSLSCTLVPRSGEQAEGSPGGPGDSQGRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSRRKP : 164
Mm : LGGDKRPFSTSSALLQG--EAEEDHVALSLSCTLVs---ERREDS PGGPGTSQGRKRRQTSMTDFYHSKRRLVFCRRKP : 159
Rn : LGGDKRPFSTSSALLQGPGEAEEDHVALSLSCTLVsHAPERREDS PGGPGTSQGRKRRQTSMTDFYHSKRRLVFCRRKP : 164
LGGd4RpSTsSALLQG pApEDHVALSLSCTLVs ErpEds PGGpGtSQGRKRRQTS6TDFYHSKRRL6FcRRKP
    
```

**B. Comparaison entre p21 chez l'Homme et chez les plantes.**

```

Hs : M----- : 1
At : MEKYIRKSKITDGAAGAGGGGGGGGGESSIALMDVVS PSSSSSLGVLTFRAKSLALQQORCLLQKPPSSPSSLPTASPNPPSKQK : 88
Os : MEKYIRKAKVVS--EVVA-----AAMMELAAAPLGVTRRARSALQKR----- : 44
Mgky rk k g v lgv tra slalq q

Hs : ----- : -
At : MKKQQQMNDCSYLQLRSRRLQKPFIVVIRSTKRRKQRRNETCGRNNPNSNLDLSIRGDCSRSDSVSESVFPCDKDLISEINKD : 176
Os : -----GELYLELRSRRLKLPPEPP-----PPRRRATAAAAATATAAAESAEAEVSPGCG----- : 94
g yl lrsrrl k pp p r d s v fg

Hs : ----- : 48
At : PTFQGNFPDLSEBHTQRTRESTPCSLIRPEPEIMTTPGSSSTRLNLCVSESNOQEDSLRSRHRRRPTPEMDEFFS--ABEEQKQFIER : 264
Os : ---ENVL--ELEAMERNTRRTPCSLIRDEDTISHPGSTRRSHSSS--HCKVOTEVRRHNIIPASAELEAFFAAEQRQRQAETDR : 173
n e e r tre tpcslir p 3tPgs t4 n c S 4 pvr h p 3 e daffag e2eqr fie4

Hs : WNFDPVNTETPLEGDFAMERVRGLGLPKLYLPTGPRGRDELGGRRPPTS PALLQGTAEEDHVDLSLSCTLVPRSGEQAEGSPGGPGD : 136
At : YNDEPVNDEQPLEGDFEEMTKV----- : 284
Os : YNDEPVNDCPLEGDFEEMTKL----- : 193
5NFDpvNe P1pGrFeW 46

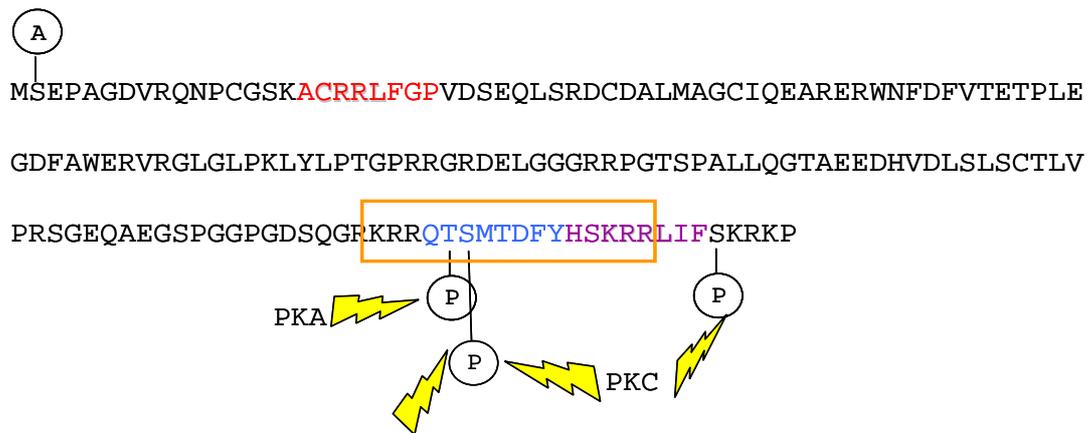
Hs : SQGRKRRQTSMTDFYHSKRRLIFSRRKP : 164
At : -----DD : 286
Os : -----D : 194
d
    
```

Hs : *Homo sapiens*, Mm : *Mus musculus*, Rn : *Rattus norvegicus*, At : *Arabidopsis thaliana*. Os : *Oryza sativa*. L'alignement a été réalisé avec le site en ligne Toffee (<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Advanced>) et le logiciel Genedoc.

La protéine p21 possède une séquence de localisation nucléaire dans le domaine C-terminal, composée des acides aminés 141 à 156 (cf. figure 42). Toutefois, la protéine peut être également localisée dans le cytosol selon les conditions. Dans les cellules normales, la localisation subcellulaire de p21 est étroitement régulée, et variable en fonction de l'état de prolifération ou de différenciation. Cette spécificité topologique est largement abrogée dans la transformation néoplasique.

p21 est une protéine subissant des modifications post-traductionnelle. Chen *et al.* montre que p21 peut être acétylée sur la sérine en position 2 [520], et contient plusieurs sites consensus qui peuvent servir de substrats pour beaucoup de kinases, incluant cdk2, ATM/ATR, AKT, PKA, PKC, CKI ou CKII. PKA et AKT1 phosphorylent p21 sur la thréonine 145 et la protéine PKC sur la sérine 146 et 160 (cf. figure 42) [521,522].

**Figure 42** : Séquence primaire, modifications post-traductionnelles et domaines de liaison de p21.



Légende :

A : acétylation

PKA/PKC : protéine kinase A/C

           : séquence de localisation nucléaire.

P : phosphorylation

: phosphoryle

Domaines de liaison aux complexes cycline/cdk :

Cy1 : **ACRRLFGP**

Cy2 : **HSKRRLIF**

Domaine de liaison à PCNA : **QTSMTDFY**

## 2. p21 est un régulateur de la prolifération cellulaire.

La progression du cycle cellulaire est contrôlée par l'activation séquentielle des complexes cycline-cdk (« cyclin dependent kinase »). L'activité de ces complexes est régulée par deux systèmes : variation de l'état de phosphorylation des kinases cdk et production ou dégradation des cyclines [523].

Le rôle premier de p21 est d'être un inhibiteur des complexes cycline/cdk [524]. Des divers CKI déjà recensés, p21 est le premier découvert et le mieux étudié. p21 a été identifié presque simultanément par plusieurs groupes comme inhibiteur des CDK (CIP1 : [525]), comme gène régulé positivement par p53 (WAF1 : [516]), et comme gène associé à l'entrée en sénescence (SDI1 : [526]). Cependant, de nombreuses études sur les relations entre les processus cellulaires et p21 ont permis de considérablement élargir ses fonctions. p21 est aujourd'hui considéré autant comme un inhibiteur qu'un activateur de la prolifération, mais il intervient également dans les processus apoptotiques, de différenciation, de sénescence et dans les processus d'infection virale.

a. p21, inhibiteur des complexes cycline/cdk.

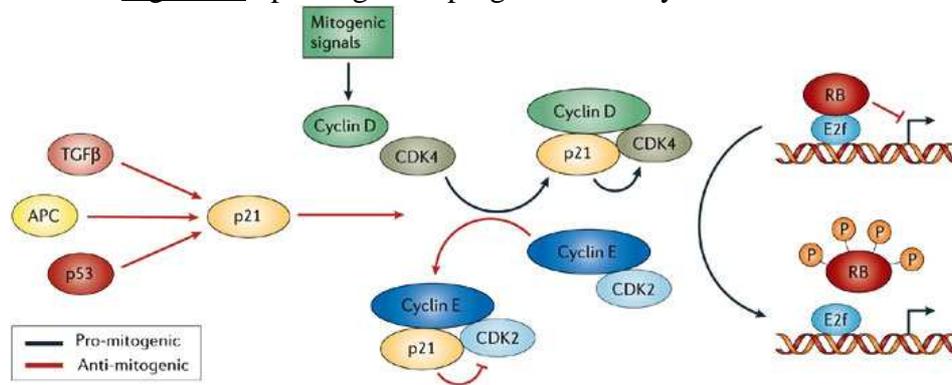
Il existe 3 familles d'inhibiteurs des complexes cycline/cdk. La première classe comprend les protéines de type INK4, qui se fixent et inhibent spécifiquement les complexes cdk4-cycline D et cdk6-cycline D, la seconde est constituée des protéines « pRb pocket » comprenant les protéines E2F1, E2F2, E2F3, p107 et p130. La troisième classe comprend les protéines de la famille Cip/Kip comme p21waf1, p27kip1 et p57 ; tous les complexes cycline/cdk sont des cibles de cette dernière famille [527,528].

La protéine p21 se lie au complexe cycline/cdk et inhibe son activité *in vitro* [525,529,530]. Une seule molécule p21 est suffisante pour se fixer par son extrémité C-terminale à une seule molécule de cycline [531,532]. Plus précisément, la liaison se fait sur p21 au niveau des motifs Cy. Le motif Cy1 (ACRRLFGP) se compose des acides aminés 17 à 24 et le motif Cy2 (HSKRRLIF) des acides aminés 152 à 158 [533]. Adams définit des motifs encore plus restrictifs en comparant les différentes protéines CKI : la séquence CRRL est commune aux inhibiteurs Cip/Kip et situé dans le domaine N-terminal de p21 (aa 18 à 21) et correspond au motif Cy1, alors que la séquence KRRL (aa 154 à 157) située en C-terminal correspondant au motif Cy2 est absente sur les protéines p27 et p57 mais est cependant commune aux protéines « pRb pocket » [534] (cf. figure 42). L'équipe de Zhang en 1994 a montré que la liaison des complexes cycline A/cdk2 et cycline D/cdk4 sur p21 se faisait sur des sites différents de p21 [535].

p21 a en premier lieu été décrit comme une cible transcriptionnelle du suppresseur de tumeur p53 [516,525]. Suite à divers stimuli activant la voie de signalisation impliquant p53, celle-ci active la production de la protéine p21 qui se fixe et inhibe l'activité de cdk2, empêchant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome Rb (cf. figure 43). Le facteur de transcription E2F ne peut alors induire la transcription des gènes de la phase S. Ce rôle peut aussi être assuré par p27 et p57, cependant leur implication dans la tumorigenèse est différente [536]. L'activation de p21 induit donc un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire en aval de p53. En effet, des souris déficientes en p21 montrent une absence de point de contrôle en G1 du cycle cellulaire [537,538]. Paradoxalement, toutes les cellules qui prolifèrent ne produisent pas obligatoirement toutes les cdk. Des études ont montré que le complexe p21-cdk2-cycline existait sous forme active et inactive [535], impliquant une fonction non inhibitrice de p21 lié à cdk2 dans certaines conditions [530,539]. Plus récemment, Martin *et al* a montré que certaines cellules proliférant ne possédaient pas de forme active de cdk2 ; cdk2 est donc superflue pour l'inhibition induite par p21 [540]. L'inhibition de la prolifération induite par p21 n'est donc pas exclusivement due à son action

inhibitrice sur les complexes cycline-cdk et le complexe p21-cycline-cdk pourrait donc avoir d'autres causes et d'autres fonctions.

Figure 43 : p21 régule la progression du cycle cellulaire.



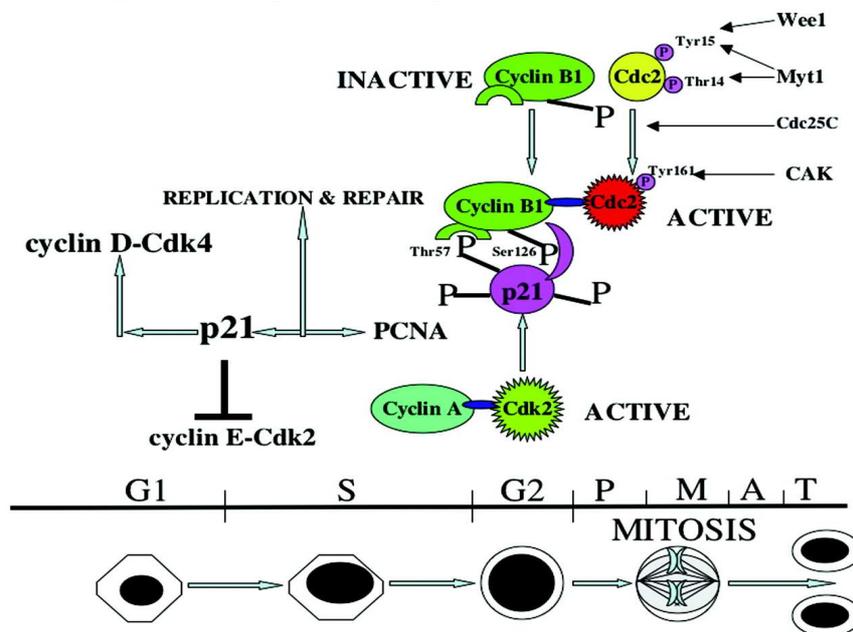
Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Cancer

p21 stoppe la progression du cycle cellulaire en inhibant le complexe cyclineE/cdk2. p21 est séquestré par le complexe cycline D/cdk4 activé qui empêche son association avec cyclineE/cdk2. Rb est un substrat majeur de ces 2 complexes cycline/cdk. L'hyperphosphorylation de Rb le dissocie d'E2F, induisant la transcription des gènes sous l'influence d'E2F, impliqués dans divers processus dont la réplication de l'ADN. *Réf.* : [541] Rowland BD and Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. Nat. Rev. Cancer. (2006) 6: 11–13.

Les premiers travaux sur l'action de p21 étaient axés sur l'arrêt du cycle en phase G1 suite à l'interaction avec cdk2 induite par p53. Mais p21 est aussi impliqué dans les phases G2 et M. Dulic *et al.* montre que p21 colocalise transitoirement avec la cycline A ou B1 dans le noyau en phase G2/M, et suggère que p21 induit une pause transitoire en fin de G2 où il joue un rôle dans le contrôle tardif du point de restriction du cycle [542]. Suite à des dommages sur l'ADN, les cellules p21<sup>-/-</sup> ne sont pas capables de maintenir un arrêt en G2/M et meurent [537,543]. Les conclusions de Dash et El-deiry sur le rôle de p21 dans l'entrée en mitose sont schématisées sur la figure 44. Durant la phase S, p21 entre dans le noyau, est hyperphosphorylé majoritairement par cdk2 sur la thréonine 57 à la transition S/G2. Avant l'activation de la phosphatase CDC25C, p21 phosphorylée se lie à la cycline B1 à un moment où cdk1 est phosphorylée sur la tyrosine 15 et faiblement associée au complexe. CDC25C activée déphosphoryle cdk1 ce qui augmente sa liaison au complexe p21-cycline B1, qui est alors activé [544]. p21 est impliqué dans le contrôle de l'activation de cdk1 pendant les premières étapes de la progression de la phase G2 vers la mitose. Au moins dans certains

tissus cdk1 serait une cible cruciale de p21 dans la tumorigenèse ; dans les cellules non stressées ou après un stress génotoxique, p21 inhibe cdk1 aboutissant à un arrêt du cycle en phase G2.

Figure 44 : Implication de p21 dans l'entrée en mitose.



p21 est hyperphosphorylé par cdk2, interagit avec le complexe cyclineB/cdk1, favorise l'activité de cdk1 et la progression du cycle cellulaire vers la mitose. P, M, A et T font référence aux phases de la mitose : prophase, métaphase, anaphase et télophase, respectivement. *Réf* : [544] Dash B. & El-Deiry W Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Molecular and cellular biology* (2005) 25 : 3364-3387.

Non seulement p21 est capable de lier tous les complexes cycline/cdk, mais cette interaction induit un effet significatif sur la progression du cycle cellulaire. En plus de la fixation aux cyclines, p21 agit aussi indirectement sur l'activité des complexes cycline/cdk en bloquant l'activation de la phosphorylation des cdk au niveau du segment d'activation [110,545], effet démontré dans le cas de la phosphorylation de cdk1 et cdk2 par Mandal *et al* [546].

- b. p21, inhibiteur de la synthèse d'ADN par interaction avec PCNA, est impliqué dans la réparation de l'ADN.

Outre l'interaction de p21 avec les complexes cycline-cdk, p21 possède également au niveau de son domaine C-terminal un site de liaison à la protéine PCNA (« proliferating cell

nuclear antigen ») composé des acides aminés 144 à 151 (cf. figure 42). Peu de mutations faux sens de p21 existent ; toutes induisent une variation plus ou moins importante de l'interaction avec PCNA [547].

La protéine PCNA est essentielle à l'activité et la processivité de l'ADN polymérase  $\delta$  et  $\epsilon$ , requises pour la réplication de l'ADN en haute fidélité et pour le système de réparation par excision [548]. Par son interaction avec p21, par exemple après stimulation par le facteur de croissance épidermique [306], PCNA est séquestrée ; p21 entre en compétition avec l'ADN polymérase ou avec d'autres protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN pour la liaison avec PCNA, ce qui induit une diminution de la croissance cellulaire [549]. Il est à noter que Cayrol *et al.* a montré que l'interaction entre ces deux protéines augmentait la stabilité de p21 [550] et induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en phase G2 dans les cellules déficientes en p53 [551].

Au-delà de l'inhibition de la synthèse d'ADN, p21 est impliqué dans la réparation de l'ADN. PCNA interagit avec des protéines directement impliquée dans les systèmes de réparation de l'ADN [549]. De ce fait, p21 inhibe le système de correction des erreurs de l'ADN polymérase (« mismatch repair »), et le système de réparation par excision de base dépendant de PCNA (« base excision repair ») [552-554]. L'interaction entre p21 et PCNA est suffisante pour inhiber les systèmes de réparation de l'ADN. Le rôle de p21 dans le système de réparation par excision de nucléotide (NER) reste controversé. Tandis que le domaine N-terminal de p21 n'a pas d'effet sur la réparation de l'ADN, le domaine C-terminal suffit à inhiber le système NER *in vitro* et *in vivo*, et son efficacité est augmentée par l'ajout de la protéine PCNA pure [555]. Fotedar *et al.* montre une probable régulation du système de réparation par excision de nucléotide (NER) dépendante de p21 après exposition des cellules aux ultra-violets [556]. Cependant, la protéine DDB2 (« DNA-damages binding protein 2 ») permet la reconnaissance des dommages dans le système NER et induit une répression du gène p21 dépendante de p53 qui est cruciale pour le bon fonctionnement du système NER [364]. Le rôle de p21 dans le système NER reste donc à approfondir.

L'interaction de p21 avec les complexes cycline/cdk et avec PCNA définissent la fonction majeure de p21 au sein du cycle cellulaire ; une inhibition des complexes cycline-cdk associée à une inhibition de la réplication de l'ADN induit un arrêt du cycle cellulaire [557,558]. De nombreuses études ont montré l'importance de p21 dans l'arrêt du cycle cellulaire. D'une part p21 inhibe les complexes cyclin/cdk par interaction directe, d'autre part il est actif au niveau génomique : il bloque la synthèse d'ADN par sa liaison avec PCNA, mais c'est aussi un cofacteur transcriptionnel qui régule l'activité de protéines liées à l'ADN,

comme myc, E2F et STAT3 ; or lorsque STAT3 est constitutivement activé, il y a transformation cellulaire et carcinogénèse [292,559-561]. De plus, la surexpression de p21 est associée à une répression des gènes du cycle cellulaire, une inhibition de la réplication de l'ADN et à une entrée en mitose [562].

c. p21 est également un stimulateur de la prolifération cellulaire.

Selon les conditions et les études, les effets de la déficience en p21 chez des souris « knock out » (KO), ou souris p21<sup>-/-</sup>, ainsi que les profils d'expression de p21 dans les cellules tumorales, concluent soit à une activité oncogénique soit à une activité de suppresseur de tumeur de p21. p21 participerait à une mitose anormale des cellules après levée de l'inhibition du cycle induite par p21. De plus, p21 est capable de stimuler la transcription de facteurs mitogéniques et anti-apoptotiques. Roninson propose l'idée selon laquelle les effets tardifs de p21 ressembleraient aux activités paracrines des cellules sénescents et à des fonctions pro-tumorales dans les fibroblastes [563].

Une étude de l'équipe de La Baer a particulièrement démontré une activité spécifique des CKI de la famille Cip/Kip. Dans les lignées ostéosarcomales U2OS, SAOS et tumorales du sein 184A1L5, p21, p27 et p57 stimulent l'association de cdk4 avec la cycline D. *In vivo* et *in vitro* l'augmentation de ces CKI est suivie d'une augmentation du taux de complexe cycline D/cdk4. Cet effet a été observé uniquement dans le cas du complexe cycline D/cdk4 et uniquement avec cette famille de CKI, et serait requis pour la progression de la phase G1 à la phase S. La balance entre effet activateur du complexe et effet inhibiteur est due à la stœchiométrie de la liaison et à la constante d'association résultante. Faiblement associé, p21 active ce complexe et vice-versa. Les Cip/Kip pourraient fonctionner comme des adaptateurs programmant les complexes cycline/cdk pour des fonctions spécifiques [564].

De même, p21 aurait une activité prolifératrice sur différentes lignées selon les stimulations : p21 est un régulateur positif dans la prolifération induite par IGF-1 (« insulin growth factor 1 ») dans les cellules du sein, [565], et protégerait les cellules musculaires lisses de l'apoptose en participant à la signalisation de la protéine Ets-1 (« v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 »). Dans ce cas, le clivage de p21 par la caspase 3 fait passer la cellule d'un état du à l'arrêt du cycle à l'apoptose [566].

d. Localisation cellulaire et implication dans la prolifération et l'apoptose.

La protéine p21 est majoritairement localisée dans le noyau où elle agit comme inhibiteur du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN. Nonobstant, sa capacité de régulation

du cycle dépend de sa sublocalisation. La phosphorylation de p21 sur la thréonine 145 par AKT1 la relocalise dans le cytoplasme tout en stabilisant la protéine, ce qui induit une perte de l'inhibition du cycle et un gain d'activité antiapoptotique, nécessaires à la fonction pro-survie de p21. Par contre, suite à l'exposition à des agents génotoxiques, p21 entre dans le noyau, colocalise avec PCNA pour promouvoir le système de réparation NER et ainsi prévenir la progression en phase S et l'arrêt du cycle [567].

Suite à des dommages sur l'ADN, l'activation de p21 induit un arrêt de la prolifération cellulaire, permettant à la cellule de réparer l'ADN et d'entrer en mitose, lorsque cela est possible, tout en prévenant l'apoptose des cellules. Cependant le rôle de p21 dans l'apoptose reste controversé. Après privation de facteurs de croissance, surexpression de p53 ou différenciation des monocytes, p21 joue un rôle anti-apoptotique. Lors de la différenciation des cellules U937 en monocytes, p21 est transloqué du noyau vers le cytoplasme et empêche la mort cellulaire. Dans ce cas, l'activité anti-apoptotique ne dépend pas de l'arrêt du cycle et ne peut être attribuée à son effet cytostatique mais à la régulation transcriptionnelle *via* ses interactions ou *via* son rôle dans la réparation de l'ADN [568]. p21 peut aussi être un oncogène dans certaines conditions, en empêchant l'apoptose et en favorisant la formation du complexe cyclineD/cdk4 ou cycline D/cdk6 [110]. Parallèlement, la fraction cytoplasmique de p21 est capable de se lier à des protéines proapoptotiques et d'inhiber leur activité comme la procaspase 3 dans la mitochondrie des cellules HepG2 [569], les caspases 8 et 10 ainsi que les protéines activées en cas de stress (SAPKs) et les kinases régulant le signal apoptotique [519].

Au contraire, une activité proapoptotique de p21 a été définie par corrélation entre l'apoptose et l'augmentation de p21 [570]. Cependant, aucune étude ne met en évidence la nécessité de p21 pour l'apoptose.

e. Régulation de p21.

Au vu de l'importance de p21 dans les processus cellulaires vitaux, l'expression et la fonctionnalité de p21 sont étroitement régulées tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel.

i. Régulation transcriptionnelle de p21.

*CDKN1A* est une cible de signaux multiples menant à l'arrêt de la prolifération cellulaire. Deux voies coexistent, l'une dépendante du suppresseur de tumeur p53 et l'autre indépendante de p53 (cf. figure 45).

- Régulation dépendante de p53.

Le facteur de transcription p53 est essentiel pour l'activation de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire dont *CDKN1A*. Le promoteur de *CDKN1A* est constitué entre autres de 2 éléments répondant à p53 conservés chez le rat, la souris et l'Homme [571]. Dans les tissus en développement et dans la plupart des tissus adultes, la transcription de *CDKN1A* ne requiert pas l'intervention de p53. Cependant, la régulation de *CDKN1A* par p53 semble essentielle à la survie cellulaire suite à des dommages sur l'ADN [572] ; l'arrêt du cycle en phase G1 résultant nécessite la présence de p21 dans les cellules colorectales humaines HCT116. Suite à l'exposition des cellules à un agent déstabilisant du faisceau des microtubules au cours de la phase G2, p53 active la transcription de *CDKN1A*, qui joue un rôle important au niveau du point de restriction post-mitotique [573].

Quelques facteurs sont impliqués dans la régulation de *CDKN1A* induite par p53, en activant ou en stabilisant l'ARNm ou la protéine p53 [574,575]. L'activation des oncogènes Ras et Raf induit une augmentation de l'expression à la fois des protéines p53 et p21. Ce mécanisme serait protecteur de la tumorigenèse. Cependant, l'activation oncogénique de Ras est présente dans de nombreux cancers ; pour Olson *et al.*, cet effet est dû à la petite GTPase Rho. Nécessaire à la transformation cellulaire par Ras, son activité principale est de réprimer la transcription de *CDKN1A* induite par Ras pour permettre le développement de la prolifération tumorale [576]. Le taux de la kinase Raf, effecteur de Ras, module la réponse cellulaire par induction de p21 *via* p53 ou non [577].

- Régulation indépendante de p53.

De nombreux facteurs influencent l'expression de *CDKN1A* sans intervention de p53. Les signaux menant à l'activation de la transcription de *CDKN1A* sont divers et généralement orientent l'activité cellulaire vers l'arrêt du cycle et la différenciation. Les facteurs de transcription induits par ces signaux se fixent sur des régions spécifiques du promoteur de

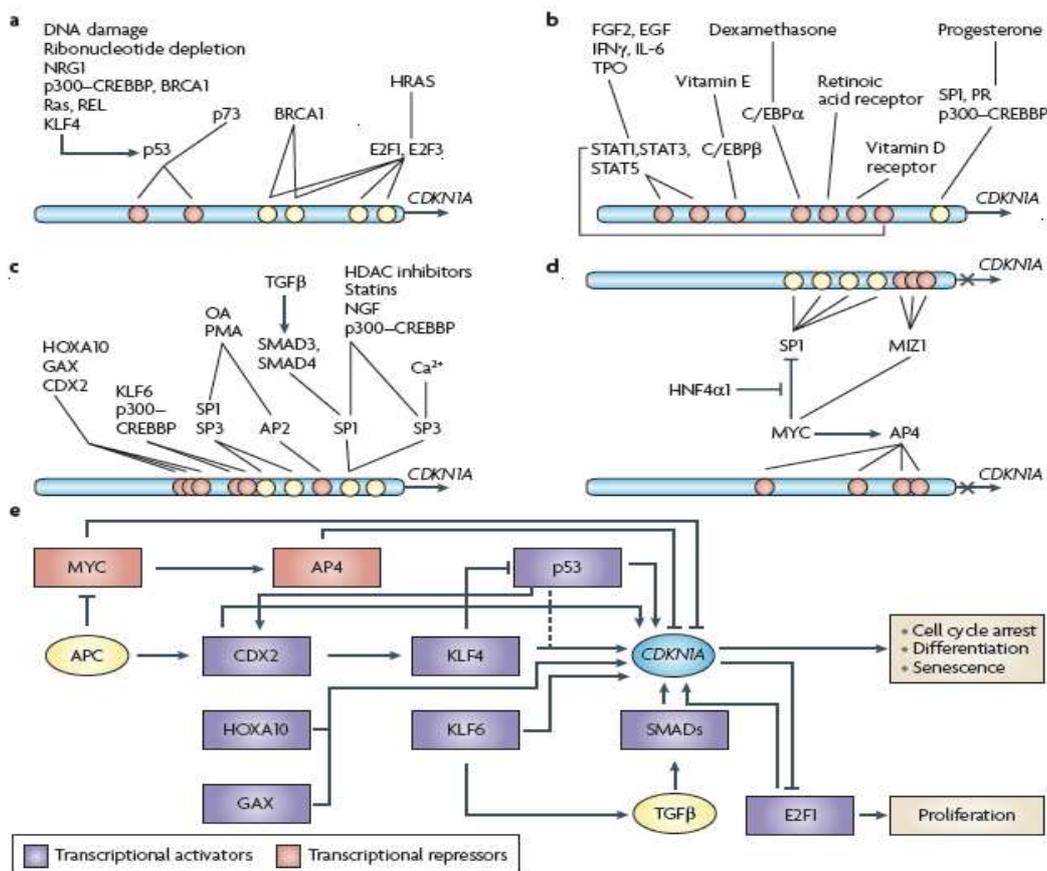
*CDKN1A* situés entre les sites n-119 et n+16, les éléments « cis-acting ». Les facteurs de transcription les plus fréquents appartiennent à la famille des facteurs Sp1, qui répondent à une variété de stimuli extérieurs, parfois en association avec les coactivateurs transcriptionnels p300 et CREB. L'activité des facteurs de transcription STATs est induite par des facteurs de croissance et des cytokines, mais d'autres effecteurs plus particuliers activent également la transcription de *CDKN1A* tels que les récepteurs nucléaires à la vitamine D, aux acides rétinoïques et aux glucocorticoïdes, tous induisant une différenciation des cellules suite à l'arrêt du cycle cellulaire.

Peu de facteurs répriment la transcription de *CDKN1A*. La répression de *CDKN1A* par l'oncogène *myc* surexprimé joue un rôle dans le développement de certaines tumeurs. Dans les cellules tumorales du sein positives au récepteur à l'œstrogène alpha ( $ER\alpha$ ), la surexpression de *myc* et la répression de p21 qui en découle stimulent la prolifération cellulaire [578]. De plus, *myc* induit l'expression du facteur de transcription AP4, qui est fréquemment surexprimé dans les cellules tumorales colorectales. AP4 peut réprimer la transcription de *CDKN1A*, inhibe l'arrêt du cycle cellulaire, sensibilise les cellules à l'apoptose induite par les dommages de l'ADN et peut supprimer l'activation de *CDKN1A* par  $TGF\beta$  [579].

*ii. Régulation post-transcriptionnelle de p21.*

Bien que l'essentiel de la régulation de p21 se situe au niveau transcriptionnel, les dernières études sur ce sujet laissent à penser que la régulation post-transcriptionnelle de p21 pourrait être tout aussi importante. La demi-vie de p21 est très courte dans les cellules en division. L'induction transcriptionnelle de p21 suite aux dommages sur l'ADN est associée à la protection de p21 contre la dégradation par WIP39 ; ces deux phénomènes mènent à la surexpression de p21 [580]. Globalement, p21 est dégradé par des mécanismes de protéolyse dépendante et indépendante des ubiquitines (cf. figure 46). Trois complexes d'ubiquitines ligases sont impliqués dans cette protéolyse :  $SCF^{SKP2}$ ,  $CRL4^{CDT2}$  et  $APC/C^{CDC20}$ . Ces complexes agissent sur p21 pour le dégrader uniquement lorsque p21 est lié respectivement aux complexes impliquant CDK2/cycline, PCNA, ou CDK1/cycline. Dans les autres cas, la dégradation de p21 est indépendante des ubiquitines. p21 interagit alors avec la sous-unité C8 $\alpha$  de la sous-unité 20S du protéasome [581].

Figure 45 : Régulation transcriptionnelle de p21.

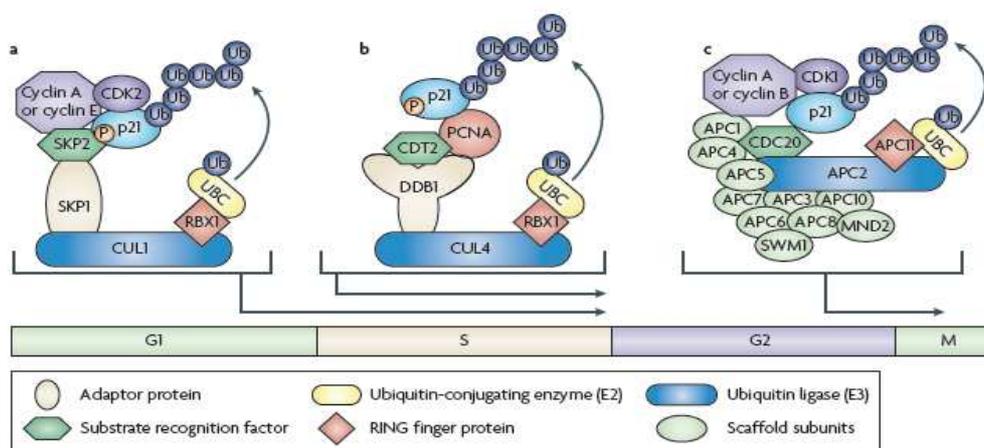


a. activation dépendante de p53 due à divers stimuli et activation par les oncogènes. b activation par les récepteurs nucléaires et les facteurs de croissance. c. activation par les agents anticancéreux ou antiprolifératifs. d. repression impliquant myc. e. schéma global de la régulation : les facteurs de transcription induisant p21 en bleu ou réprimant p21 en rouge amène à l'arrêt du cycle, à la sénescence ou à la différenciation.

Cercles jaunes : sites de liaison aux facteurs Sp1      Cercles oranges : cis-éléments.

Réf: [110] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer : intricate networks and multiples activities Nat Rev Cancer (2009) 9 : 400-414

Figure 46 : Protéolyse de p21 dépendante des ubiquitines lors d'un cycle physiologique.



a. Dégradation par le complexe « SCF<sup>SKP2</sup> (SKP1–CUL1–SKP2) E3 ubiquitin ligase » durant la transition G1/S et durant la phase S. b. Dégradation par le complexe « CRL4<sup>CDT2</sup> (CUL4A or CUL4B–DDB1–CDT2 (DDB1 is DNA damage-binding protein 1)) E3 ubiquitin ligase » durant la phase S lorsque p21 est lié à PCNA ou lors d'exposition à des ultra-violets. c. Dégradation par le complexe « APC<sup>CDC20</sup> (anaphase-promoting complex (APC)–cell division cycle 20) E3 ubiquitin ligase » durant la phase G2. L'inhibition de ce complexe durant le point de contrôle des microtubules de la phase G2 stabilise p21 et empêche l'entrée en mitose. *Réf*: [110] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer : intricate networks and multiples activities Nat Rev Cancer (2009) 9 : 400-414.

Divers facteurs affectent la stabilité de p21 pour moduler le cycle cellulaire. TGFβ et BMP2 stabilisent p21 dans les cellules colorectales [582,583] tandis que l'activation de JNK1 suite à un stress oxydatif inhibe son ubiquitination [440] et que certains virus tumoraux contrôlent le cycle cellulaire et l'apoptose par cette voie. La stabilité et la localisation de p21 sont également sous l'influence de phosphorylations de certains résidus. Le complexe cyclineE/cdk2 phosphoryle p21 sur la sérine 130 induisant sa liaison au complexe d'ubiquitine SCF<sup>SKP2</sup> ; la dégradation de p21 entre autres permet le passage de la phase G1 à la phase S [584]. AKT1 phosphoryle la thréonine 145, dissocie le complexe p21/PCNA, relocalisant de p21 vers le noyau et stimulant la prolifération des cellules cancéreuses du sein [547,585]. La kinase GSK3β phosphoryle p21 sur la thréonine 57 pour le dégrader [586], alors que la phosphorylation sur la sérine 146 par AKT1 ou PKCδ augmente sa stabilité et la survie cellulaire [587,588].

f. Implication de p21 dans le cancer.

Les multiples fonctions de p21 dans la progression du cycle cellulaire et dans la survie laissent à penser que p21 est un élément clé de la prolifération tumorale. Cependant dans les cancers humains les mutations entraînant la perte de fonction de p21 sont rares, alors qu'il est fréquemment sous-exprimé dans la plupart des cancers, dont ceux du poumon et du colon.

Beaucoup d'études sur l'implication de p21 dans le processus tumoral sont issues d'études *in vivo* sur les souris. Chez les souris, la délétion de p21 résulte en un développement spontané de tumeurs mais dont le commencement est tardif [589]. Un résultat similaire a été démontré dans une seconde étude : Franklin *et al.* en 2000 montre la collaboration des divers inhibiteurs des complexes cycline/cdk (CKI). La perte des CKI p18 et p27 induisent un développement spontané de tissus hyperplasiques ou tumoraux dès 3 mois chez les souris, par exemple au niveau du pancréas et de l'estomac. La perte des CKI p18 et p21 quant à elle induit entre autres des hyperplasies gastriques multifocales et des tumeurs bronchioalvéolaires ; cependant, ces tumeurs se développent plus tard dans la vie des souris. L'augmentation de l'activité des cdk durant la phase G1 est une étape critique mais pas suffisante de la croissance tumorale. Il y aurait collaboration entre les diverses CKI selon les organes, conférant un nouveau niveau de régulation du contrôle de la prolifération cellulaire et de la suppression tumorale [590]. De plus, dans les cancers intestinaux, l'élimination des 2 allèles de *CDKN1A* augmente la fréquence et la taille des tumeurs. La diminution d'expression de p21 est aussi un marqueur de faible pronostic chez les patients [591].

Pour autant, la perte de p21 seule n'est pas suffisante pour favoriser la progression tumorale. Abbas et Dutta ont répertorié les dérégulations de p21 dans les principaux cancers. Par exemple, l'inhibition des fonctions de TGF $\beta$ , dont la transactivation de p21, est significatif de nombreux cancers [592] alors que l'absence d'expression de p21 tout comme sa surexpression dans le cancer du sein peut être un facteur de mauvais pronostic [110,593,594].

p21 ne fonctionne donc pas comme d'autres suppresseurs de tumeurs ; il agit en synergie avec d'autres suppresseurs de tumeurs et contre les activités des oncogènes. Même s'il n'est pas l'unique, p21 est le déterminant majeur de protection tumorale par p53 [595]. En effet, la dérégulation de l'expression de p21 dans le cancer est souvent corrélée avec une perte de fonction des activateurs de la transcription comme p53. En outre, la surexpression ou la modification de ses fonctions due à des mutations jouent un rôle dans le processus tumoral.

Il existe notamment des liens entre la répression de p21 et la malignité tumorale. La répression de p21 est inversement corrélée avec l'instabilité des microsatellites dans les cancers colorectaux sans lien avec le statut de p53 [596]. Lors de la surexpression de

l'oncogène PML-RAR [597], de BCR-ABL [598] ou la délétion de Ink4 [599], p21 influencerait les effets des dommages sur l'ADN pour favoriser la transformation et la prolifération cellulaire et protégerait de l'instabilité génomique dans les cellules souches hématopoïétiques. Mais le lien avec une augmentation de la progression tumorale est encore à définir [597]. La perte de protection contre l'instabilité génomique par p21 contribuerait à la malignité tumorale.

De plus, l'absence d'expression de p21 favorise la progression tumorale simultanément à la coexpression des oncogènes myc et ras [600]. Le développement des tumeurs où l'oncogène myc est surexprimé est en partie dû à la répression transcriptionnelle de myc sur *CDKN1A*, comme dans le cas des cellules tumorales du sein ER $\alpha$ . La perturbation de la voie myc-p21 contribue à l'apparition de résistance aux thérapies utilisant des anti-œstrogènes [578].

L'importance de p21 dans le cancer est également ressentie au vu des effets de nombreuses drogues anticancéreuses sur son expression. Dans une revue parue en 2003, Liu répertorie les différentes drogues utilisées dans les thérapies anticancéreuses qui ont une activité sur p21 [601]. La figure 47 en est un aperçu. Quelques agents anticancéreux agissent, au moins en partie, en induisant *CDKN1A* ; c'est le cas des inhibiteurs d'histones acétylases, des statines, de l'anti-inflammatoire sulindac et du gefitinib. Le traitement de souris p21<sup>-/-</sup> avec un carcinogène, l'uréthane, induit un développement plus rapide des tumeurs par rapport aux souris p21<sup>+/+</sup> [602]. Dans les souris hétérozygotes pour l'oncogène Apc1638, l'inactivation ciblée de *CDKN1A* accroît la formation de tumeurs intestinales alors que l'inactivation totale de *CDKN1A* élimine la capacité du sulindac d'inhiber la formation de tumeurs induite par Apc1638. p21 est donc essentiel à l'inhibition tumorale, au moins par cette drogue [603]. Le gefitinib, inhibiteur du récepteur à l'EGF, induit p21 et un arrêt de la croissance, réduite dans le cas d'une inactivation de p21 [604]. Parallèlement, Yao *et al.* montre une corrélation entre l'expression transitoire de p21 et l'irradiation des glioblastomes ; inversement une diminution du taux de p21 est corrélée avec la résistance des cellules aux radiations [605]. Le traitement avec des agents chimiopréventifs naturels comme les rétinoïdes ou avec un inhibiteur de la COX2 arrêtent les cellules en phase G0 ou G1 associé à une induction de p21 [295,606,607].

Figure 47 : Activité d'agents thérapeutiques sur p21.

Role de p21	Agent thérapeutique	cancer	taux de p21/statut
p21, inhibiteur du cycle cellulaire	Gefinitib	cervical	↑
	Radiations	glioblastome	↑ et ↓ selon la lignée cellulaire
	Reservatrol	hépatique	↑
	Rétinoïdes	hépatique	↑
	Vitamine D3	prostatique	↑
	Interféron alpha	pancréatique	↑
	NS-398	lingual	↑
p21, inducteur de l'apoptose	Adénovirus exprimant p21	ovarien, endométrial, cervical	↑ (expression exogène)
	Inhibiteurs d'histone déacétylase, Butyrate de sodium	glioblastome	↑
	Velcad, Inhibiteur du protéasome, PS-341	leucémie	↑
	Manumycine et Manumycine combinée au Paclitaxel	thyroïdien	↑
	Acides rétinoïque de type trans combinés à l'adénovirus exprimant p21	pulmonaire, colorectal	↑ (expression exogène)
	Acide rétinoïque	hépatique	↑
	Cisplatine	hépatique	↑ (expression exogène)
	Raltitrexed, Méthotrexate, Doxorubicine	osseux	↑
	Camptothécine	pulmonaire	clivage par les caspases
	Chlamydocine	ovarien	clivage par les caspases
p21, inhibiteur de l'apoptose	Doxorubicine 0,2µg/ml	prostatique	↑
	Doxorubicine 1µg/ml	prostatique	
	Camptothécine 20nM	colorectal	↑
	Camptothécine 250nM	colorectal	↑
	Daunomycine, Etoposide, Doxorubicine	colorectal	↑
		colorectal	↑

Parallèlement, d'autres modes d'action existent. Le Velcade, inhibiteur du protéasome, induit une inhibition de la croissance et une apoptose en stabilisant p21 [608]. p21 peut induire l'apoptose et sensibiliser les cellules à la chimiothérapie indépendamment de p53 dans des cellules ayant eu de faibles dommages sur l'ADN [609]. De même, p21 joue un rôle dans la sensibilité de cellules tumorales colorectales humaines aux traitements par la manumycine et le paclitaxel [452,610]. Le traitement par la daunomycine de la lignée colorectales HCT116 p21<sup>-/-</sup> résulte en une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et en une activation de la caspase 9, alors que ces effets sont inexistantes dans les cellules HCT116 p21<sup>+/+</sup>. p21 exerce donc un effet antagoniste sur la voie mitochondriale apoptotique. p21 maintiendrait le potentiel homéostatique dans le cas d'un contrôle négatif de l'expression de p14/ARF [611].

Toutes ces études impliquent p21 dans les multiples étapes menant à la tumorigénèse. Malgré cela, la capacité de p21 d'augmenter la prolifération cellulaire complique le rôle de celui-ci dans le processus tumoral. p21 est régulièrement surexprimé dans plusieurs cancers

dont celui de la prostate ou du sein. De plus, dans de multiples cas, cette surexpression est corrélée avec un mauvais pronostic et une forte agressivité des tumeurs [110]. Il est intéressant de noter que dans ces cas, p21 est cytoplasmique. p21, à faible stœchiométrie, peut également favoriser la progression tumorale en associant la cycline D avec cdk4 ou cdk6 sans inhiber leur activité [564]. Cette notion de concentration pourrait expliquer pourquoi l'activité tumorale de p21 varie en fonction de son expression ; par exemple, la perte d'un seul allèle de p21 accélère la croissance tumorale [612].

Toutefois, au vu des régulations complexes des fonctions de p21, utiliser les drogues ciblant p21 dans une thérapie nécessite des précautions. Modifier l'expression de p21 pour réguler la prolifération cellulaire risque non seulement de diminuer la prolifération mais risque aussi d'avoir des conséquences sur l'induction de la sénescence, sur la réparation de l'ADN ou sur l'efficacité d'autres anticancéreux.

g. Autres fonctions.

i. *p21 & sénescence.*

La sénescence cellulaire est un état d'arrêt irréversible ou réversible de la croissance des cellules somatiques. Cet arrêt peut être induit par différents stimuli exogènes (radiations UV, drogues chimiothérapeutiques) ou endogènes (activation des oncogènes Ras, Raf, stress oxydatif). Deux formes de sénescence existent, répllicative et accélérée, et p21 participe à chacune d'elle. Les cellules capables de se diviser ne peuvent le faire indéfiniment. A chaque cycle cellulaire les télomères, qui protègent l'intégrité des chromosomes, se raccourcissent jusqu'à une limite où l'intégrité du génome ne peut plus être assurée; les cellules entrent alors en sénescence répllicative après arrêt du cycle cellulaire La sénescence répllicative est un processus lent et physiologique, contrairement à la sénescence accélérée qui est généralement due à d'importants dommages sur l'ADN que la cellule ne peut réparer ou à des oncogènes. La sénescence représente un programme de protection contre la prolifération illimitée et est donc un mécanisme suppresseur de tumeur et une réponse anti-cancérogène [563].

L'implication de p21 dans la sénescence a été répertoriée pour la première fois par l'équipe de Noda où p21, nommé SDI1, apparaît surexprimé dans les fibroblastes en sénescence [526]. Depuis, quelques études ont fourni des précisions quant à son rôle dans ce processus. Dans la plupart des conditions, p21 est exprimé de façon transitoire, ce qui suggère un rôle de p21 uniquement dans les premiers stades de développement du processus [613].

Dans les cellules de mammifères, le point de contrôle de la sénescence est initié par l'induction de l'une de ces deux voies de signalisation : p53/p21 et p16/Rb [524,614]. Les

cellules hématopoïétiques n'exprimant pas p21 contournent le point de contrôle de sénescence, ont donc une durée de vie plus élevée sans toutefois montrer de signe d'instabilité chromosomique [615]. La sénescence répllicative est marquée par une activation consécutive des inhibiteurs du cycle cellulaire p53, p21 et p16 [563]. Les travaux de Fang et de Chang ont montré que les cellules cancéreuses, sous l'influence d'agents anticancéreux, étaient capables d'entrer en sénescence accélérée par l'inhibition d'oncogènes et l'induction de suppresseurs de tumeur tels que p21. La sénescence est induite par l'expression de p21 dans les cellules de fibrosarcome HT1080 et dans les cellules de mélanome ayant subi une privation en polyamines. De plus, cette induction de p21 due à l'absence de polyamines provoque le développement d'un phénotype sénéscent *via* l'activation de plusieurs gènes de type anti-apoptotiques et mitogènes induits par p21 [616-618]. La sérine/thréonine kinase CKII (« casein kinase II ») est nécessaire à la progression du cycle cellulaire à la fois lors des phases G1 et G2/M [619]. *Via* l'activation de p53, CKII induit une augmentation du taux de transcrits de *CDKN1A*. Dans les cellules colorectales HCT116 ainsi que dans les fibroblastes, l'inhibition de CKII induit la sénescence qui est fortement atténué dans les cellules HCT116 p53<sup>-/-</sup> et p21<sup>-/-</sup> [620].

La surexpression de p21 est un évènement précoce de la sénescence répllicative, contrairement à p16 qui intervient des semaines après l'initiation de l'arrêt du cycle cellulaire [621]. Cependant cette surexpression de p21 n'est pas présente dans toutes les cellules sénéscentes ; cette présence hétérogène suggère que p21 n'est pas un déterminant majeur du vieillissement cellulaire, contrairement à p16. Il est à noter qu'au niveau de la crypte basale de l'épithélium intestinal de souris dont les télomères ne sont plus fonctionnels, moins de 5% des cellules sont positives au marquage de p21 [622]. Wagers *et al.* montre l'existence d'un point de contrôle dépendant de p21 qui limite le maintien des cellules souches et d'une fonction de p21 dans la réponse aux dysfonctionnements des télomères [623]. Ju conclue qu'un niveau d'expression basal de p21 est nécessaire au maintien de la quiescence des cellules souches dans un but de protection contre les stress génotoxiques aigus. Parallèlement, une augmentation du taux de p21 induit une limite de renouvellement cellulaire et de fonctions de ces cellules souches adultes dans le cas de stress génotoxiques aigus induit par le dysfonctionnement des télomères [622].

Dans une revue parue en 2002, Roninson discute des possibles effets intercellulaires dus à l'expression de p21. La surexpression de p21 suite à une induction de sénescence dans les fibroblastes ou suite à l'activation d'un régulateur de p21 (exemple du TGFβ) provoquerait des effets paracrines sur les cellules épithéliales, et ce *via* la production de

facteurs anti-apoptotiques et mitogènes décrite par Kramer *et al.* [563,618]. Ces effets paracrines pourraient alors être à l'origine d'une transformation néoplasique des cellules épithéliales adjacentes aux fibroblastes du stroma.

En conclusion, la protéine p21 serait donc un acteur essentiel de l'initiation de la sénescence cellulaire, processus maintenu par l'expression plus tardive mais plus constante d'autres acteurs tels que p16.

*ii. p21 & différenciation.*

La différenciation cellulaire est le processus par lequel les cellules se spécialisent en un type cellulaire. Par exemple, les cellules embryonnaires de l'endoderme se différencient en plusieurs types : intestinal, pulmonaire, gastrique ou œsophagien. Pour se différencier, une cellule doit sortir du cycle cellulaire ; ces 2 processus sont donc couplés [624]. Ainsi l'intervention de p21 dans ce processus est tout à fait crédible. De plus, un taux élevé de p21 est retrouvé dans plusieurs tissus très différenciés [625].

Parmi les premiers travaux mettant en évidence p21, ceux concernant l'implication de p21 dans la différenciation cellulaire portaient sur les cellules myéloïdes, d'où l'attribution du nom MDA6, pour « Melanoma differentiation-associated protein 6 ». Dans les cellules leucémiques p53<sup>-/-</sup> exposées à un stimulus pro-différenciation, l'arrêt du cycle cellulaire est induit par p21. Freerman *et al.* démontre que la dérégulation de p21 dans ces cellules interfère avec un arrêt du cycle en phase G1, avec la différenciation et avec la perte de survie en l'absence d'altération du complexe E2F [626]. De plus, l'absence de surexpression de p21 dans la lignée leucémique U937 différenciée par du butyrate de sodium induit un arrêt du cycle en G1 ou l'expression du marqueur de différenciation et de maturation CD11b [627].

Toutefois, les mécanismes d'action de p21 dans ce processus sont mal compris. L'étude menée *in vivo* par Zhang *et al.* en 1999 montre l'implication de p21 dans le contrôle de la différenciation des cellules musculaires. Chez la souris, l'absence de p21 ou de p57 n'induit pas de phénotype particulier, du à la redondance des mécanismes mis en jeu. Par contre, l'absence des deux protéines ne permet pas la formation de myotubes et augmente la prolifération et l'apoptose des myoblastes [274,628]. Ce phénotype est similaire à celui observé chez les souris Rb<sup>-/-</sup>, protéine essentielle à la sortie permanente des cellules du cycle cellulaire [629-631]. Le rôle de p21 et de p57 serait de réguler négativement les activités des cdk pour maintenir Rb dans une forme active et donc les cellules musculaires hors du cycle cellulaire. De même, p21 coopère avec p57 pour contrôler la différenciation et la morphogenèse dans les cellules pulmonaires de souris indépendamment du cycle cellulaire [274]. Dans les cellules colorectales Caco-2, la différenciation s'accompagne d'une

suppression des activités de cdk2 et cdk4 précédant le blocage du cycle en G1, blocage induit par l'augmentation du taux de p21 [632].

p21 serait impliqué dans les premiers stades du processus de différenciation et ne serait pas requis pour le maintien du phénotype [633,634]. Bien que peu d'études portent sur le rôle de p21 dans la différenciation cellulaire, comme pour la sénescence, p21 apparaît comme un acteur de l'initiation du processus et ne participerait pas aux stades plus avancés ou au maintien de cet état.

### *iii. p21 & autophagie.*

L'autophagie est un processus physiologique assurant le renouvellement des protéines et des organelles cellulaires. Elle peut aussi être utilisée comme source alternative d'énergie quand la cellule est privée de nutriments. Excessive, elle induit une mort cellulaire autophagique, tandis qu'elle est inactive dans différents cas de cancers ou de maladies neurodégénératives. Comme l'apoptose c'est un programme de mort cellulaire. La relation fonctionnelle entre apoptose et autophagie est complexe, l'autophagie représentant aussi un mécanisme de défense cellulaire et toutes 2 sont détectées dans des conditions physiologiques et pathologiques incluant le processus tumoral [635]. Levine et Yang discutent dans une revue de 2005 de ce lien [636]. Les voies de l'autophagie et de l'apoptose sont intriquées parce qu'elles font appel aux mêmes molécules de signalisation telles que les caspases : dans l'autophagie elles sont inactivées [637]. Toutefois, les molécules régulant l'entrée de la cellule en autophagie plutôt qu'en apoptose et inversement sont peu déterminées. p21 régule positivement ou négativement de l'apoptose [638], et de ce fait pourrait intervenir dans la régulation de l'autophagie. Peu de travaux mentionnent une activité de p21 dans ce processus ; l'autophagie induit une variation de l'expression de p21 sans toutefois mettre en évidence un rôle concret. Une induction de l'autophagie par le temsirolimus [639] réprime p21 et une inhibition de l'autophagie associée à une induction de l'apoptose par la bafilomycine A1 entraîne la surexpression de p21 [640]. Parallèlement, Mazzanti *et al.* montre que l'induction de l'autophagie par le celecoxib induit une surexpression de p21 [641].

L'équipe de Fujiwara donne à p21 un rôle de pivot entre l'entrée de la cellule en autophagie ou en apoptose. Des fibroblastes embryonnaires murins sauvages (p21<sup>+/+</sup>) et mutés sur p21 (p21<sup>-/-</sup>) ont été traités avec du C(2)-ceramide [642]. La céramide, aux effets similaires à ceux provoqués par l'irradiation, induit l'apoptose et est stimulée par p21 [643,644], mais elle est aussi impliquée dans la mort cellulaire par autophagie [645]. Dans les cellules p21<sup>+/+</sup>, le traitement induit le clivage de la caspase 3 et la dégradation des protéines de l'autophagie Beclin-1 et Atg5, menant à une apoptose. Au contraire, le traitement des cellules p21<sup>-/-</sup>

stabilise la Beclin-1 et Atg5 et n'induit pas de clivage de la caspase 3. L'inhibition de p21 dans les cellules p21<sup>+/+</sup> mène à une autophagie aux dépens de l'apoptose, contrairement à la surexpression de p21 dans les cellules p21<sup>-/-</sup> qui augmente le nombre de cellules apoptotiques. p21 aurait donc un rôle essentiel dans la détermination du type de mort cellulaire en privilégiant l'apoptose. p21 inhiberait l'autophagie en déstabilisant les protéines relatives à ce processus sans influencer l'activité des complexes cycline/cdk [642].

*iv. p21 & virus.*

En plus de ses fonctions au sein d'une cellule saine ou tumorale, p21 est également impliqué dans l'interaction hôte-virus. Le cycle cellulaire peut être altéré par de nombreux virus, les plus fréquents étant le polyomavirus, les papillomavirus, les adénovirus et les rétrovirus. Les virus affectent la stabilité et la régulation transcriptionnelle de p21 pour modifier la prolifération cellulaire. Le virus lymphotrope des cellules T humain de type 1 (HTLV-1) associé à la leucémie des cellules T chez l'adulte, tout comme l'*herpeviridae* bovin BoHV4, associé à des dommages sur l'ADN, active le promoteur de p21. La transformation des lymphocytes T est principalement due à l'activité de la protéine virale phosphorylée Tax. Or Tax est capable d'activer le promoteur de p21 indépendamment de p53 [646,647]. De plus, dans les fibroblastes Rat-1 infectés par ce virus, l'expression de p21 stimule la transformation en cellules immortalisées et prévient l'apoptose [648]. L'expression dans le cytoplasme des protéines de la capsid du virus de l'hépatite C inhibe spécifiquement la synthèse de p21 contribuant à la tumorigenèse induite par ce virus [649,650]. La protéine ZTA du virus Epstein Barr (EBV) stoppe le cycle cellulaire par un mécanisme impliquant p21 et indépendant de p53. ZTA se lie à la protéine C/EBP alpha (« CCAAT/enhancer binding protein alpha ») ce qui favorise la différenciation et provoque l'arrêt du cycle cellulaire à la transition de la phase G1 à la phase S en stabilisant p21 et en activant sa transcription [651].

Le papillomavirus HPV est capable de transformer les cellules et de les rendre immortelles, notamment les cellules épithéliales du sein, par l'expression d'oncogènes viraux, E6 et E7. Parallèlement il a été montré que p21 était impliqué dans la transformation de ces cellules. [652]. Le parvovirus AAV de type 2 (« adeno-associated virus type 2 ») réprime p21 dans les cellules infectées par le HPV afin de favoriser sa réplication [653] alors qu'après dommages sur l'ADN, E6 réprime p21 et favorise l'apoptose [654]. Dans la cellule saine, la phosphorylation de p21 sur la sérine 130 par cdk2 induit l'ubiquitination de p21 et sa dégradation [584]. La cycline K, codée par le virus de l'herpès 8 favorise cette phosphorylation par cdk6, sans changer la localisation cellulaire de p21. Dans le cas des

cellules infectées, p21 ne se lie plus à cdk2, diminuant ainsi l'arrêt du cycle en G1 imposé par p21 [655].

Parmi les virus régulant p21, le rétrovirus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV-1) et son activité sur p21 ont été beaucoup plus étudiés, probablement à cause de l'importance infectieuse du HIV et des milliers de nouveaux cas détectés par jour. Le virus HIV-1 infecte les cellules du système immunitaire et préférentiellement les lymphocytes T4. Vpr, requise pour la rétro-transcription du génome viral, empêche les cellules de proliférer en induisant un arrêt du cycle en phase G2 par inhibition du complexe cyclineB/ckd1, afin que le virus puisse s'intégrer. De plus, Vpr affecte les régulateurs du cycle cellulaire dont p21 [656]. Dans les lymphocytes T4 infectés par le HIV-1, l'irradiation induit une perte du point de contrôle de la transition des phases G1/S, associée à une perte de p21 et à une augmentation de l'activité du complexe cyclineE/ckd2. Tat, régulateur viral nécessaire à la réplication, se lie à p53 et le séquestre, empêchant la transcription de *CDKN1A*. La perte de p21 est spécifique, elle n'est pas observée dans le cas de p27 et p57 [647]. Contrairement aux lymphocytes T4, les macrophages infectés par le HIV-1 résistent plus à la mort cellulaire, supportent la réplication virale et donc peuvent faciliter la transmission du virus. Vpr régule la transcription de gènes associés à la défense de l'organisme, à la transduction du signal, à l'apoptose et au cycle cellulaire, parmi lesquels p21 est le plus proéminent. Le taux de p21 est maximal au moment de la réplication du virus. Dans les macrophages p21 agit comme un accélérateur du cycle de vie du virus [657]. Les cellules souches hématopoïétiques, dont le « réservoir » est régulé par p21, sont quant à elles résistantes à l'infection par le HIV-1. Cette résistance serait due au blocage de l'infection par l'interaction entre p21 et l'intégrase virale, évitant ainsi l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire [658]. Wu *et al.* a utilisé le composé chimique 9-aminoacridine (9AA) qui, à de faibles concentrations, réactive la voie p53 et restaure les fonctions de p21 tout en inhibant la réplication du virus. La phosphorylation de p53 sur la sérine 15 permettrait la dissociation de p53 de Tat, activant *CDKN1A* [659]. L'inhibition par le 9AA est proportionnelle à la dose de 9AA utilisée, sans inhiber la prolifération cellulaire ou induire la mort. p21 est phosphorylé sur la sérine 146, ce qui accroît sa stabilité ; p21 se lie alors au complexe cycline T1/ckd9, inhibant la transcription virale et est recruté au complexe de préintégration du virus. p21 aurait donc un rôle direct dans la transcription du HIV [657,660].

Bien que les mécanismes par lesquels les protéines virales affectent la stabilité ou l'activité de p21 soient inconnus, le ciblage de p21 est un mécanisme commun par lequel les virus régulent la progression du cycle cellulaire et l'apoptose à leur avantage.

#### h. Conclusion.

La protéine p21 possède donc de nombreuses fonctions. Par l'inhibition du fonctionnement des complexes cycline/cdk et de la synthèse d'ADN par séquestration de PCNA, p21 stoppe la progression du cycle cellulaire et permet à la cellule de réparer son ADN, tout en prévenant l'apoptose. En effet, une cellule morte avec un ADN réparé est un gaspillage d'énergie cellulaire. Ainsi p21 est en premier lieu un régulateur négatif de la progression du cycle cellulaire par deux voies distinctes en ciblant simultanément les gènes de prolifération et l'activité des cdk suite à des stress variés [559].

Outre son activité d'inhibiteur des complexes cycline/cdk, p21 est également impliqué dans les fonctions nécessitant un arrêt du cycle cellulaire comme la réparation de l'ADN, l'apoptose, la sénescence, la différenciation et l'interaction hôte-virus. Les conclusions de la majorité des travaux menés depuis 15 ans sur les fonctions de p21 amène à définir p21 comme un capteur des signaux extracellulaires et intracellulaires. p21 est un pivot déterminant mais pas unique qui amène la cellule à s'engager dans une voie plutôt que dans une autre. Les mécanismes aboutissant à ce choix *via* l'action de p21 restent peu déterminés et paraissent de plus en plus complexes, à l'image des fonctions de p21 dans l'apoptose ou dans la prolifération cellulaire. Dong *et al.* pose le postulat suivant : l'orientation de p21 vers une activité inhibitrice ou stimulatrice de la prolifération est due à sa localisation cellulaire. La phosphorylation de p21 sur la thréonine 145 induit une localisation cytoplasmique, une levée de l'inhibition de la prolifération cellulaire [567] et une protection contre l'apoptose [453,568].

C'est pourquoi l'étude des interactions de p21 avec d'autres protéines prend de l'importance. La détection de nouveaux partenaires d'interaction de p21 permet d'approfondir ses fonctions voire de comprendre l'environnement nécessaire à l'engagement de p21 vers tel ou tel processus.

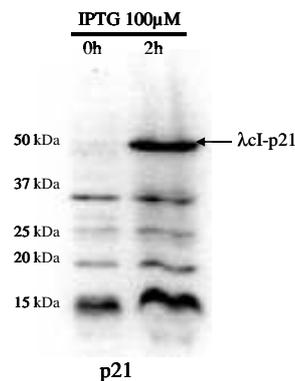
## II. Double hybride de p21.

### 1. Faisabilité de la technique.

Les 2 conditions *sine qua non* de la mise en place du double hybride bactérien, production recombinante de la protéine appât et absence d'activation du gène rapporteur par la protéine appât seule, ont été réalisées conformément au protocole. Dans le cas de p21, comme dans celui de STAT3-Cter, les 2 conditions sont remplies.

Après production de la biomasse, la production recombinante a été induite avec 100 $\mu$ M d'IPTG pendant 2h à 37°C sous agitation à 225rpm et vérifiée par western blot dont l'anticorps utilisé est dirigé contre la protéine p21. La protéine  $\lambda$ cI a une masse moléculaire de 27kDa et p21 de 20kDa, p21- $\lambda$ cI a donc une masse moléculaire de 47kDa. Comme dans le cas de STAT3-Cter- $\lambda$ cI, la protéine est correctement produite par la bactérie (cf. figure 48).

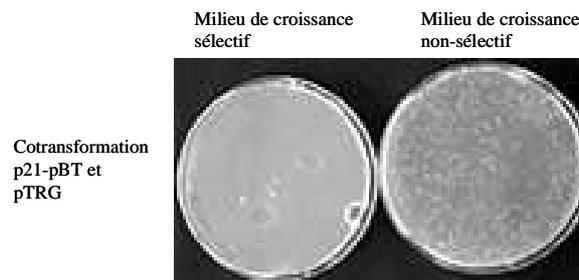
Figure 48 : p21- $\lambda$ cI est produite par les bactéries du système double hybride.



Western blot à l'aide d'un anticorps anti-p21 de la production recombinante de p21.

Le test de « self-activation » est également négatif pour p21. Les bactéries sont cotransformées avec le plasmide recombinant de la protéine appât et le plasmide cible vide et étalées sur milieu sélectif et non sélectif. Après incubation, le pourcentage de clones obtenus sur milieu sélectif par rapport au nombre de clones obtenus sur milieu non sélectif est calculé. Aucun clone n'apparaît après incubation sur milieu sélectif (cf. figure 49). Parallèlement, des milliers de clones ont crû sur milieu non sélectif. Il n'y a pas d'activation du gène rapporteur suite à la production recombinante de l'une ou l'autre des protéines appâts, le pourcentage de clones sur milieu sélectif par rapport aux clones sur milieu non sélectif étant inférieur à 0,1%.

Figure 49 : La production des protéines appât n'induit pas d'activation du gène rapporteur en l'absence de cibles.



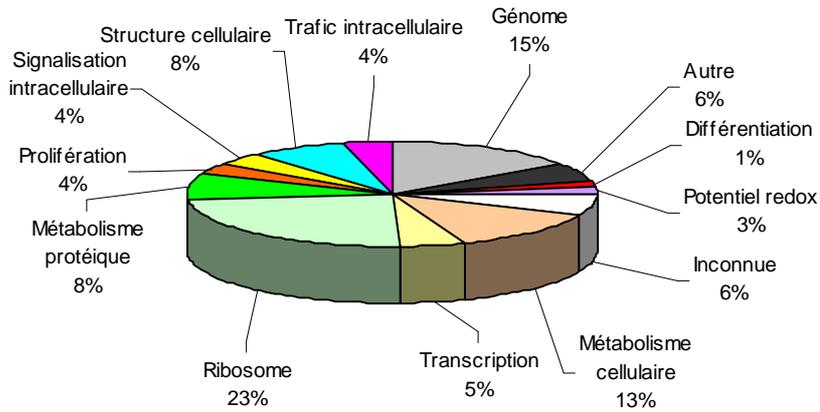
## 2. Crible de la banque d'ADNc humaine par p21.

Le crible d'une partie de la banque d'ADNc par double hybride bactérien a permis d'obtenir 86 clones positifs. Après séquençage, il s'avère que parmi les résultats, 3 comportent des séquences génomiques, 9 des séquences issues du génome mitochondrial, 20 des séquences codant des protéines ribosomales, 48 codant des protéines dont 2 séquences redondantes, et un clone vide. Les 6 clones restant comportent des séquences codant 3 protéines différentes ; pour chaque protéine, 2 séquences différentes existent, codant une partie différente de la protéine (cf. tableau 4 ci-après).

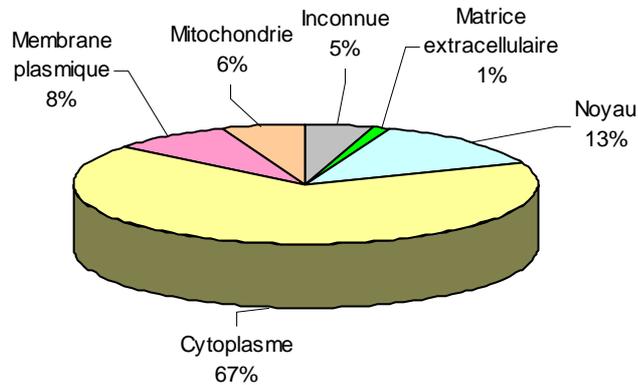
L'analyse des résultats a été réalisée de la même manière que pour STAT3. Comme précédemment, les clones obtenus ont été classés en fonction de leur nature fonctionnelle (cf. figure 50A), de leur localisation subcellulaire (cf. figure 50B) et de leur fonction ou de leur implication dans les processus cancéreux, qu'elles soient avérées ou supposées (cf. figure 51). Comme dans le cas du double hybride de STAT3, 15% des clones obtenus comportent des séquences génomiques, et plus de la moitié des clones (56%) codent des protéines ribosomales, des protéines liées à la production des protéines *in vivo* ou des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire et l'organisation de la cellule. La majorité des protéines codées sont cytoplasmiques (73%), et parmi celles-ci 67% sont cytosoliques (cf. figure 50B).

**Figure 50 :** Répartition des partenaires potentiels de p21 obtenus.

*A. Répartition des partenaires en fonction de leur nature fonctionnelle.*

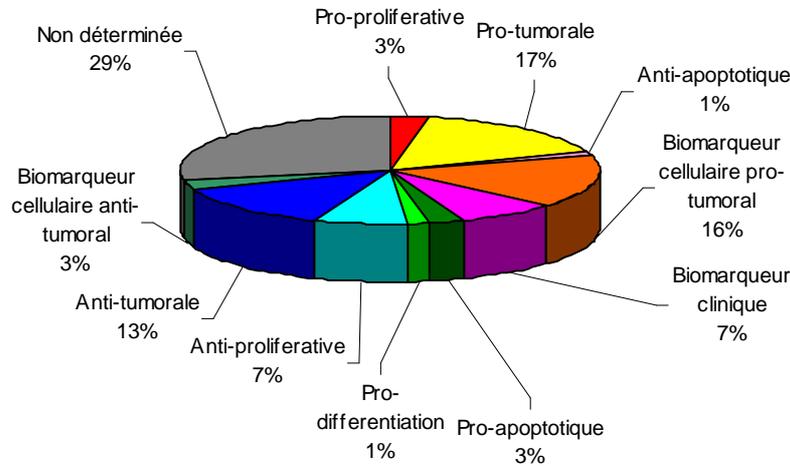


*B. Localisation subcellulaire des partenaires.*



Les premières études mettant en évidence p21 ont été réalisés à partir de travaux sur différents processus : prolifération, différenciation et sénescence [516,526,626]. Dans la dernière décennie, les diverses publications ont mis en lumière un rôle de plus en plus complexe pour cette protéine, et notamment dans les processus cancéreux. Ainsi, le choix a été fait de présenter les partenaires potentiels obtenus en fonction de leur implication dans la progression tumorale. La figure 51 ci-dessous donne un aperçu des types de partenaires potentiels obtenus ; l'effet tumoral d'une protéine regroupe ici à la fois un effet sur la prolifération, sur la migration cellulaire et sur l'apoptose.

**Figure 51** : Répartition des partenaires potentiels de p21 obtenus en fonction de leur activité cancéreuses (hypothétique ou démontrée).



Le tableau 4 ci-après définit pour chaque partenaire les activités tumorales décrites dans la littérature, lorsque cela est possible. Lorsque c'est le cas, la présence de redondance est indiquée par le nombre de clones trouvés. Quelques clones sont présents en plusieurs exemplaires mais ne possèdent pas la même séquence ; dans ce cas, les acides aminés (aa) codés par chaque séquence ainsi que le nombre d'acides aminés totaux composant la protéine sont indiqués. Dans la littérature existante à ce jour, 13 candidats ne présentent d'activité particulière au cours des processus tumoraux. Pour certains d'entre eux, aucune fonction n'a même été mise en évidence dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Deux candidats ont été classés dans ce groupe parce que les études à leur sujet au cours de la prolifération tumorale amènent des conclusions opposées. Certaines protéines ne possèdent apparemment d'activité particulière dans la progression tumorale mais une modulation de leur expression est régulièrement trouvée dans diverses études ; ces protéines sont définies ici comme des biomarqueurs. Le terme biomarqueur désigne une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou non. Il est une signature biologique de l'effet et non la mise en évidence directe de la cause. Les biomarqueurs peuvent aussi révéler un évènement passé. De ce fait, un biomarqueur n'est pas uniquement une protéine mesurable de manière simple utilisable pour la recherche clinique comme le sont la gonadotrophine chorionique humaine, marqueur de la grossesse, et l'antigène prostatique spécifique (PSA), marqueur du cancer de la prostate.

Tableau 4 : Partenaires potentiels d'interaction avec p21.

Nom	N° Uniprot	Fonction/Implication dans les processus cancéreux	Référence (s)
<b>Protéines anti-tumorales</b>			
<i>Suppresseur de tumeur</i>			
ANXA2 : "annexin A2"	P07355	Réponse au stress thermique. Assemblage du virus HIV. Interagit avec PHB1 et PHB2. Rôle double dans les fonctions de l'oncogène v-Src. Régulée durant le cycle cellulaire. Surexprimée dans quelques formes de cancer. Inhibition de la synthèse d'ADN et de la division cellulaire. Induction de l'apoptose dépendante de p53, de la sénescence ou de la différenciation.	[443,661-666]
PRDX1 : "peroxiredoxin 1"	Q06830	Suppresseur de tumeur en réponse aux stress oxydatifs. Interagit avec les oncogènes c-abl et c-myc. Prolifération et apoptose	[439,440,667,668]
PRDX2 : "peroxiredoxin 2"	P32119	Suppresseur de tumeur. Sénescence. Inhibe l'apoptose induite par p53 . Réprimé par le resvératrol	[439,440,443,668]
<i>Apoptose/Prolifération</i>			
GAPDH : "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase "	P04406	2 clones codant des régions différentes : aa 1-263 et aa 58-325 sur 325 aa totaux. Apoptose neuronale induite par p53 qui stimule son expression.	[418,419,503]
GSTP1 : "glutathione S-transferase pi"	P09211	Suppression de l'expression protéique dans la majorité des cas de néoplasie intraépithéliale de faible pronostic. Réduit la prolifération cellulaire et protège les cellules contre l'apoptose via la kinase JNK. Cible transcriptionnelle de p53.	[431-433]
RARRES3 : "retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3"	Q9UL19	Régulateur négatif de la croissance due aux rétinoïdes induit par le taratozène.	[669,670]
PHB2 (REA, BAP37) : "prohibitin 2"	Q99623	2 clones codant des régions différentes : aa 1-128 et aa 86-299 sur 299 aa totaux. Possible suppresseur de tumeur. Régulation négative du récepteur aux oestrogènes. Apoptose. Différenciation. Progression de la mitose. Biomarqueur. Infection virale	[275,671-679]

<b>Réponse au stress</b>			
FTH1 : "ferritin, heavy polypeptide 1"	P02794	Expression réprimée après transformation des cellules par l'oncogène Ras. La surexpression réduit l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène en réponse à des dommages oxydatifs cellulaires	[465,466]
FTL : "ferritin, light polypeptide"	P02792	Expression réprimée après transformation des cellules par l'oncogène Ras. La surexpression réduit l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène en réponse à des dommages oxydatifs cellulaires . Biomarqueur pronostic dans le cancer du sein	[465-467]
<b>Protéines pro-tumorales</b>			
<b>Oncogène</b>			
CAPNS1 : "calpain, small subunit 1"	P04632	Régulation positive de la prolifération. Taux élevé pendant la transformation maligne. Requisite pour l'autophagie et la survie de cellules cancéreuses. Migration de cellules métastatiques et angiogenèse. Interagit avec cdk4. Modulateur de la réponse aux stress et aux dommages. Cible pour la thérapie anticancéreuse.	[680]
PI3KCA : "phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide"	P42336	Oncogène et biomarqueur clinique. Mise au point de traitements. Polymorphisme à la base de mutations impliquées dans les processus cancéreux.	[41,443,562,681-683]
<b>Apoptose/Prolifération</b>			
ACADVL : "acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain"	Q53HR2	Protéine discriminante entre le carcinome et l'adénome adrénocortical. Réprimé par l'agent antitumoral indisulam qui modifie le cycle cellulaire à plusieurs niveaux et induit p53 et p21.	[684,685]
CDK4 : "cyclin-dependent kinase 4"	P11802	Interagit avec p21 pour inhiber le cycle cellulaire. S'associe à la cycline D au cours de la phase G1, active E2F1 pour le passage en phase S. Mutations à l'origine de formation de tumeur (Mendelian Inheritance in Man (MIM) n°609048, n°155600).	[686,687]
COX15 : "Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog"	Q7KZN9	Cytochrome c. Augmentation de viabilité des cellules HeLa. Inhibition de l'apoptose induite par des radicaux oxygénés.	[688]
HELZ : "Probable helicase with zinc finger domain"	P42694	Répression dans les cellules cancéreuses qui inhibe la croissance cellulaire.	[642]

STS-1 : "Cbl-interacting protein"	Q8TF42	Possède un domaine SH3. Interagit avec l'ubiquitine ligase Cbl. Inhibe l'internalisation des récepteurs de l'EGF et du PDGF induite par le proto-oncogène Cbl et prolonge l'activation des voies de prolifération cellulaire.	[689]
ZNF306 : "Zinc Finger Protein Zfp47"	Q9BRR0	Facteur de transcription associé à la prolifération maligne. Croissance cellulaire sans adhésion à un support et croissance tumorale orthotopique. Augmente la prolifération tumorale et la résistance au 5-fluorouracil, traitement usité dans le cancer colorectal.	[690]
EF1A1 : "Elongation factor 1-alpha 1"	P68104	Son interaction avec C-Raf augmente sa stabilité et induit la survie. Impliqué dans la mort cellulaire indépendante des caspases. Facteur de stimulation de la migration.	[374-378,691,692]
<b>Réponse au stress/Migration/Métastases</b>			
KRT8 : "cytokeratin-8"	P05787	2 clones codant des régions différentes : aa 200-483 et aa 375-483 sur 483 aa totaux. Invasion et métastases. Dégradée par les caspases. Résistance à l'apoptose. Coexprimée avec KRT18 dans les cellules au phénotype de résistance multiple aux drogues anticancéreuses.	[451-453,693]
FLOT1 : "flotillin 1"	O75955	Activité pro-tumorale potentielle.	[694]
GRN : "granulin (proepithelin)"	Q53Y88	Sécrétée. Inflammation, Réparation et Remodelage des tissus. Stimule la migration et l'invasion. Activation de la voie ERK1/2. Stimule croissance, migration et affranchissement d'un support pour la croissance cellulaire. Son précurseur est important dans la progression tumorale et dans la réponse aux drogues chimiques. Marqueur pronostic dans les carcinomes ovariens.	[427-430,695]
M-RIP : "myosin phosphatase-Rho interacting protein"	Q6WCQ1	Cible de la voie de signalisation des JNK. Invasion.	[696]
PGES2 : "prostaglandin E synthase 2"	Q9H7Z7	Homéostasie du potentiel redox. Les prostaglandines PGE2 et (PG) E(2) (PGE(2)) synthétisées par PGES2 jouent un rôle prédominant dans la stimulation des carcinogénèses colorectales. Interagirait avec l'oncogène c-myc.	[697]
THOC5 : "THO complex 5"	Q13769	2 clones identiques. Complexe THO/TREX qui interagit avec PI3KCA. Différentiation. Le complexe TREX a été défini comme un responsable de l'agressivité des cancers du sein.	[698]

TLN2 : "talin 2"	Q9Y4G6	Phosphorylation par cdk5 ce qui régule la liaison de Smurf1 à la taline, contrôlant ainsi sa demi-vie, la stabilité de l'adhésion et in fine, la migration cellulaire.	[699]
<b>Implication dans les processus viraux.</b>			
CD81 : "cluster of differentiation 81"	P60033	Antigène qui régule la croissance des lymphocytes. Régule la cytotasie des astrocytes. Système immunitaire, transduction du signal des cellules lymphocytes B et T. Récepteur pour le virus de l'hépatite C.	[700-702]
PPIA : "cyclophilin A" "peptidylprolyl isomerase A"	P62937	Pro-tumorale. Cible de la ciclosporine A, agent immunosuppresseur. Présence d'auto-anticorps dans les sera de patients atteints de cancer du sein. Surexprimée dans les cancers du poumon à petites cellules. Active la voie de signalisation ERK. Intégration du provirus, initiation de l'infection et contrôle de la réplication du génome viral, notamment dans le cas d'une infection par le virus HIV1.	[438,703,704]
SUPT4H : "suppressor of Ty 4 homolog 1 (S. cerevisiae)"	P63272	2 clones codant des régions différentes : aa 1-117 et aa 26-116 sur 117 aa totaux. Appartient au complexe DSIF. Requisite pour l'activation de la transcription par Tat (virus HIV).	[705,706]
WBSR1 : "Williams-Beuren syndrome chromosome region 1"		Séquence nucléique génomique. Intégration du virus de l'hépatite B (HBV) dans cette région. Potentialise la propagation clonale du virus. Carcinogénèse hépatique.	[707]
<b>Biomarqueurs</b>			
ATP5D : "ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit"	Q6FG90	Biomarqueur. Surexprimée dans l'adénocarcinome du poumon.	[708]
COX8A : "Cytochrome c oxidase subunit 8A, mitochondrial"	P10176	Biomarqueur. Complexe du cytochrome c. Marqueur d'évènement précoce de l'apoptose.	[709,710]
ECH1 : "Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial"	Q13011	Altération de l'expression dans les cellules carcinomales hépatiques	[569]
GSTO2 : "glutathione S-transferase omega 2"	Q9H4Y5	Son polymorphisme est un facteur de risque pour la leucémie aigüe infantile et pour le cancer de l'estomac.	[711,712]

MUC5A homolog : "PREDICTED: similar to Mucin-5AC (Mucin 5 subtype AC, tracheobronchial)"	P98088	Biomarqueur discriminant entre le carcinome intestinal de type gastrique et la métaplasie incomplète intestinale, où p21 est exprimée dans presque 50% des cas	[713]
RABGGTA : "Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit"	Q92696	Biomarqueur potentiel.	[714]
<b>Protéines dont les fonctions dans les processus cancéreux sont inconnues</b>			
ABHD14A : "abhydrolase domain containing 14A protein"	Q9BUJ0	Pas d'informations	-
COPE : "coatomer protein complex, subunit epsilon"	O14579	Pas d'informations	-
FLJ23316 : "Homo sapiens mRNA similar to hypothetical protein FLJ23316 (cDNA clone IMAGE:2822035)"		Pas d'informations	-
GABARAP : "GABA(A) receptor-associated protein"	O95166	Rôle ambigu. Expression réduite dans les tumeurs du sein. Suppresseur de tumeur. Augmentation de l'expression dans les adénomes et les cancers de la thyroïde. Rôle dans les premiers stades de la tumorigenèse thyroïdienne.	[306,715]
LRRC14 : "leucine rich repeat containing 14 protein"	Q15048	Pas d'informations	-
MLF2 : "myeloid leukemia factor 2"	Q15773	Pas d'informations. Très similaire à MLF1, oncogene impliqué dans la leucémie myéloïde aigüe.	[716,717]
P117 (QIL1) : "hypothetical protein P117"	Q5XKP0	Pas d'informations	-
RANBP9 : RAN binding protein 9	Q96S59	Rôle ambigu. Implication dans l'apoptose ou la croissance cellulaire. Stabilise l'isoforme alpha de TP73 et augmente son activité proapoptotique après traitement avec du cisplatine. Expression affectée par TERT et ATM. La surexpression pourrait causer une activation constitutive de la voie oncogénique Ras.	[522,718,719]

SFRS2 : "Splicing factor, arginine/serine-rich 2 protein"	Q01130	Pas d'informations	-
SYTL1 : "synaptotagmin-like 1"	Q8IYJ3	Pas d'informations	-
TBC1D2 : "TBC1 domain family, member 2"	Q8WUA7	Pas d'informations	-
UBA52 : "ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1"	Q3MIH3	2 clones identiques. Pas d'informations	-
UBE2R2 : "ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2".	Q712K3	Pas d'informations	-

### III. Discussion et conclusion.

Comme nous l'avons vu précédemment, p21 est une protéine aux fonctions diverses mais essentielles dans nombre de processus cellulaires. Au travers de la littérature, quelques partenaires d'interaction ont été mis en évidence. Les complexes cycline/cdk, PCNA, les kinases phosphorylant p21 telles qu'AKT1 ou PKC, mais aussi les ubiquitines participant à sa dégradation sont naturellement les premiers partenaires de p21. Au-delà des protéines agissant sur p21 ou subissant directement l'action de p21, il existe d'autres protéines formant un complexe avec p21. Par exemple, p21 interagit avec les protéines MCM10 et géminin qui interviennent dans la réplication de l'ADN [720], avec les suppresseurs de tumeurs RB1 et TP53 [721,722], ainsi qu'avec certains facteurs de transcription tels que FOXO1 et E2F4 (« NCI-Nature Pathways Interaction Database » : [www.pid.nci.nih.gov](http://www.pid.nci.nih.gov), « Reactome Pathways » : [www.reactome.org](http://www.reactome.org)).

Toutefois, au vu des implications de p21 au sein de la cellule, la liste des partenaires mis en évidence ne peut être exhaustive. C'est pourquoi une partie de ce travail s'est porté sur la mise en évidence de nouveaux partenaires de p21, d'une part afin d'approfondir les fonctions de p21 dans le cancer et d'autre part afin d'étendre ces fonctions au modèle végétal. En effet, p21 n'est pas référencé chez *Medicago truncatula* et ses orthologues chez *Arabidopsis thaliana* et chez le riz [723] présentent peu d'homologies avec la protéine humaine (cf. figure 41B). Pourtant, la cellule végétale réalise aussi le cycle cellulaire qui est soumis à une régulation dépendante des complexes cycline/cdk [724], impliquant l'existence de protéines inhibitrices des complexes cycline/cdk. Chez *Arabidopsis thaliana*, 7 inhibiteurs sont répertoriés, nommés ICK ou KRP ("inhibitor/interactor with cyclin-dependent kinase"), dont KRP4, l'orthologue de p21 [725,726]. L'étude des partenaires d'interaction de p21 peut permettre d'étendre les résultats chez le modèle *Medicago truncatula* et ainsi par extension définir l'orthologue de p21 dans ce modèle.

Nous avons choisi de réaliser le double hybride de p21 à partir de la même banque d'ADNc utilisée pour celui de STAT3. Particulièrement, le traitement au préalable des cellules colorectales avec du SN38, inhibiteur de la topoisomérase II, a induit une surexpression de p21 dans cette lignée, augmentant la probabilité de la présence du plus grand nombre de partenaires d'interaction. Nous avons mis en évidence près d'une cinquantaine de nouvelles protéines interagissant avec p21. Toutefois, comme dans le cas de STAT3, ces interactions ont été mises en évidence dans un modèle bactérien, ce qui ne permet pas de

conclure sur l'existence de ces complexes *in vivo* mais d'obtenir une liste de candidats potentiels.

En partant du postulat que la majorité des interactions découvertes ici se révèlent vraies, le rôle de p21 au sein de la cellule se trouve élargi par cette étude et devient extrêmement complexe. Toutefois, de nombreuses interactions semblent plus être dues au métabolisme général de p21 et non à sa fonction. De plus, beaucoup des partenaires ici retrouvés ont une activité dans le cancer plus ou moins importante : les biomarqueurs par exemple ne semblent pas jouer de rôle actif, mais sont seulement représentatifs de l'état de la cellule. Dans ce cas, leur interaction avec p21 semble peu crédible et ne serait du qu'à une homologie de séquence d'un ou plusieurs domaines.

De nombreuses similitudes existent entre les résultats obtenus avec STAT3 et avec p21 comme protéines appâts : proportion et type de partenaires obtenus, présence de séquences génomiques, des mêmes protéines ribosomales, de protéines impliquées dans l'organisation cellulaire. De même que pour STAT3, la diversité des familles de protéines retrouvées reflète en partie la complexité des actions de p21. La plupart des protéines ribosomales retrouvées font également partie des résultats du double hybride de STAT3 (RPL18, RPL13 et RPL29 par exemple), renforçant l'idée d'une interaction non spécifique et due à la biosynthèse protéique.

Onze protéines sont communes aux 2 double hybrides : EF1A1, FTH1, FTL, GAPDH, GRN, GSTP1, KRT8, PPIA, PRDX1, PRDX2 et UBA52. Les protéines EF1A1, FTH1, FTL, GAPDH, GSTP1 et KRT8 participent au métabolisme et à l'organisation cellulaire ; elles ne sont probablement pas engagées dans une interaction spécifique avec p21. Cependant, elles ont toutes des activités cancéreuses : FTH1 et FTL protègent la cellule contre les stress oxydatifs [465], GAPDH et EF1A1 sont impliquées dans l'apoptose [378,503], GSTP1 et KRT8 dans la prolifération tumorale [431,453]. Bien que l'interaction avec la partie C-terminale de STAT3 soit peu probable à cause de la localisation subcellulaire, celle avec p21 semble plus crédible. Néanmoins, ces interactions ne présentent pas un intérêt majeur.

Parmi les candidats, aucun des partenaires mis en évidence dans ce crible par double hybride n'a été référencé dans la littérature comme protéine interagissant avec p21 hormis la protéine cdk4. La présence d'un partenaire connu permet de valider le double hybride avec p21 comme protéine appât. Parmi les résultats obtenus, l'un des partenaires, CAPNS1, interagit également avec cdk4. La petite sous-unité 1 de la calpaïne (CAPNS1) participe au remodelage du cytosquelette, à la transduction du signal et à régulation positive de la prolifération. Modulateur de la réponse aux stress et aux dommages, la calpaïne représente

une cible pour la thérapie anticancéreuse. Le taux est élevé pendant la transformation maligne, est requise pour l'autophagie et la survie de cellules cancéreuses et joue un rôle clé dans la migration de cellules métastatiques et l'angiogenèse [680]. Au vu de ces informations, l'interaction entre p21 et la calpaïne est probable. Il serait intéressant de vérifier l'hypothèse d'une compétition entre p21 et la calpaïne pour la liaison à cdk4, menant soit à un arrêt du cycle soit à la prolifération cellulaire.

Il est intéressant de noter que l'un des partenaires potentiels est impliqué à la fois dans la prolifération tumorale et dans l'infection virale, 2 processus dans lesquels p21 est actif. La cyclophiline A (« PPIA »), également retrouvée dans le double hybride de STAT3, aurait une activité pro-tumorale et est impliquée dans l'intégration du provirus, l'initiation de l'infection et le contrôle de la réplication du génome viral, notamment dans le cas d'une infection par le virus HIV1 [703]. Des auto-anticorps anti-PPIA ont été détectés dans les séras de patients atteints de cancer du sein [704]. Comme dans le cas de la calpaïne, la cyclophiline A pourrait être à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bien que l'interaction de p21 avec la plupart des partenaires potentiels soit possible, nous en avons gardé 4 : l'annexine A2, les peroxydases 1 et 2 et PHB2.

L'annexine A2 (ANXA2) agit sur de nombreuses fonctions modulées par p21. Protéine régulatrice du taux de calcium intracellulaire, elle participe au développement du système squelettique, peut entre autre être impliquée dans la réponse au stress thermique et est essentielle à l'assemblage du virus HIV dans certains monocytes [666]. Hayes *et al.* a mis en évidence un rôle double d'ANXA2 dans les fonctions de l'oncogène v-Src [665]. L'annexine A2 est régulée durant le cycle cellulaire et est surexprimée dans quelques formes de cancer. Des études impliquent l'annexine A2 dans des fonctions antiprolifératives par inhibition de la synthèse d'ADN et de la division cellulaire [662], induction de l'apoptose dépendante de p53 [443], de la sénescence [663] ou de la différenciation [664]. L'annexine A2 partage donc beaucoup de fonctions avec p21, ce qui en fait un partenaire d'interaction très probable. Toutefois nous n'avons pas choisi d'étudier cette interaction en premier lieu ; la forte similarité des fonctions des 2 protéines ne nous a pas semblé intéressante pour la mise en évidence de nouvelles fonctionnalités de p21.

Les peroxydases 1 & 2 (PRDX1 et PRDX2) régulent le potentiel redox de la cellule et protègent ainsi les tissus en éliminant des peroxydes générés par le métabolisme et en régulant la concentration intracellulaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PRDX1 & PRDX2 sont considérés comme des suppresseurs de tumeur en réponse aux stress oxydatifs [440]. PRDX1 induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses œsophagiennes [667] et PRDX2 est impliquée dans la

sénescence et inhibe l'apoptose induite par p53 suite aux stress oxydatifs [442,443]. p21 est régulièrement activé en réponse aux stress oxydatifs ; une interaction avec les peroxyrédoxines pourrait participer à cette réponse ainsi qu'à l'inhibition de la progression tumorale. Ces deux protéines interagissent également avec le domaine de transactivation de STAT3, comme nous l'avons vu précédemment. Une vérification de l'interaction *in vivo* doit absolument être réalisée avant toute étude fonctionnelle afin d'écartier la possibilité d'un domaine consensus présent chez PRDX1 et PRDX2.

Enfin, nous nous sommes particulièrement intéressés à la prohibitine 2 (PHB2). Deux séquences différentes codant chacune une partie de cette protéine ont été retrouvées, l'une codant les acides aminés 1 à 128 et l'autre les acides aminés 86 à 299. La partie commune résultante correspond au domaine PHB, présent chez toutes les protéines de la famille prohibitine. Il est à noter que PHB2 interagit avec l'annexine A2 [661]. Les membres de la famille des prohibitines sont extrêmement conservés au cours de l'évolution et sont présentes dans les organismes de tous les règnes phylogéniques. Des orthologues de PHB2 ont notamment été référencés chez le riz (Os07g0262200, n° NCBI NP\_001059325.1) et chez *Arabidopsis thaliana* (ATPHB2 n° NCBI NP\_171882.1). Bien qu'initialement localisée dans la mitochondrie, PHB2 est également présente dans le noyau et le cytoplasme [727,728]. Ses fonctions sont détaillées dans la partie suivante. Succinctement, les prohibitines sont impliquées dans la régulation de la transcription [677,678,729] dans la cohésion des chromosomes [275], dans la signalisation cellulaire, l'apoptose [730,731], ainsi que dans la biogenèse de la mitochondrie et l'intégrité du génome mitochondrial [732,733]. Nous avons choisi de poursuivre l'étude de l'interaction entre p21 et PHB2 au vu des informations que nous disposons sur l'expression et les fonctions de PHB2 détaillées dans la partie qui suit.

En conclusion, cette étude, à l'image de celle de STAT3, ouvre de réelles perspectives d'études. D'une façon générale, p21 protège la cellule de la transformation néoplasique en activant l'arrêt du cycle cellulaire. Par la suite, p21 semble avoir un rôle de pivot faisant passer la cellule d'un état d'arrêt de la prolifération à un état de mort ou de différenciation. Son activation est sensible à différents stress dont l'hypoxie et les dommages sur l'ADN. Bien que certaines interactions semblent plus probables que d'autres, il sera intéressant de vérifier dans un premier temps les interactions de p21 avec les protéines de stress mises en évidence dans cette étude chez l'Homme, comme les peroxyrédoxines et l'annexine A2 afin de comprendre comment p21 amène la cellule à s'engager dans un processus spécifique selon le stimulus initial.

## Partie 3 : Interaction entre p21 et PHB2.

### I. Etat actuel des connaissances sur la prohibitine 2.

La prohibitine 2 (PHB2) est une petite protéine de 37kDa dont la séquence primaire est schématisée sur la figure 52A (N° accès Uniprot Q99623). Trois domaines existent : un domaine N-terminal transmembranaire, un domaine central, commun à toutes les protéines de la famille des prohibitines, nommé PHB ou SFPH et un domaine C-terminal de type « coiled-coil ». Le nom prohibitine 2 provient de la forte homologie existant entre cette protéine et la prohibitine, renommée de ce fait prohibitine 1 (PHB1) (cf. figure 52B). Toutefois, 2 autres noms lui ont été assignés : BAP37, pour « B cell associated protein » [734] et REA pour « repressor of estrogen activity » [678]. Essentiellement mitochondriales, les prohibitines peuvent également être localisées dans le cytosol et dans le noyau. Dans ces derniers cas, PHB1 et PHB2 peuvent agir en complexe ou séparément, et leurs fonctions ne sont pas toujours similaires.

Figure 52 : Séquence primaire de PHB2.

A : Domaines.

```

1  MAQNLDKDLAG RLPAGPRGMG TALKLLLGAG AVAYGVRESV FTVEGGHRAI FFNRIGGVQQ
61  DTILAEGLHF RIPWFQYPII YDIRARPRKI SSPTGSKDLQ MVNISLRVLS RPNAQELPSM
121 YQRLGLDYEE RVLPSIVNEV LKSVVAKFNA SQLITQRAQV SLLIRRELTE RAKDFSLILD
181 DVAITELSF S REYTA AVEAK QVAQQEAQRA QFLVEKAKQE QRQKIVQAEG EAEAAKMLGE
241 ALSKNPGYIK LRKIRAAQNI SKTIATSQNR IYLTADNLVL NLQDESFTRG SDSLIKGGK
  
```

: domaine transmembranaire

: domaine PHB/SFPH

: domaine « coiled-coil »

B : Alignement de PHB2 avec PHB1.

```

Q99623 | PHB : MAQNLDKDLAGRLPAGPRGMCTALKLLLGAGAVAYGVRESVFTVEGGHRAIEFNRIQGVQDDTILAEGLHFRIPWFQYPIIYDI : 83
P35232 | PHB : MAARVEESIQR-----FGDALAVAGV-----VNSALYNVDAGHRAVIFDRRQVQDIIIVVGCETHFRIPWFQYPIIYDI : 69
      MA 6 G4 G AL 6 G V 65 V GHRA6 F1R GVQ D 66 EG HF IPW Q PII5D

Q99623 | PHB : RARPRKISSPTGSKDLQMVNISLRVLSRPNAQELPSMYQRLGDDYBERVLPSTVNEVLKSVVAKFNASQLITQRAQVSLILTRR : 166
P35232 | PHB : RSRPRNVVITLTSKDLQNVNITLRLIREVVASQLERIEPTSLGDDYBERVLPSTVTEILKSVVARFDAQELITQRELVSROWSD : 152
      R RPR 6 TGSKDLQ VNI3LR6L RP A 2LP 65 6G DY ERVLPSTI E6LKSVA4F1A 2LITQR V8 6

Q99623 | PHB : ELTERAKDFSLILLDDVATTELSFSREYTA AVEAKQVAQQEAQRAQFLVEKAKQEQRQKIVQAEGEAEAAKMLGEALSKNEGY : 248
P35232 | PHB : ELTRRAATEGLILLDDVSLTHLTFCKEETFAVEAKQVAQQEAERARFVVEKAEQKKAAIISAEGDSRAABLTIANSLATAGDGL : 235
      LTRER A F LILLDDV 6T L3F 4E5T AVEAKQVAQQEA2RA F6VERA Q2 4 I6 AEG AA 66 L 3 G

Q99623 | PHB : ELKLRRIAAQNISKTIATSQNRRIYLTADNLVLNLQDESFTRGSDSLIKGGK : 299
P35232 | PHB : ELRLRLAAEDLAYQLSRSRNITYLPA-----QSVLLQLPQ : 272
      I LRK6 AA2LI 6 S N YL A G L6
  
```

Diverses fonctions ont été attribuées aux prohibitines : régulation du cycle cellulaire, apoptose, assemblage des enzymes de la chaîne respiratoire, vieillissement, et plus récemment, régulation de l'infection virale. Les 2 protéines sont induites par des stress métaboliques causés par le déséquilibre entre les synthèses de protéines mitochondriales codées par les gènes nucléaires et mitochondriaux. Par contre elles ne sont pas sensibles aux stress oxydatifs, au choc thermique ou à d'autres stress cellulaires [735].

PHB2 a un rôle crucial dans les phases précoces du développement embryonnaire, puisque la suppression des 2 allèles est létale au stade embryonnaire. L'ablation d'un seul allèle de PHB2 chez des souris montre une viabilité similaire à celle des souris sauvages [736,737]. Il est intéressant de noter que la mort embryonnaire est également observée dans le cas d'une ablation totale de PHB1 [738]. De plus, le taux d'ARNm de PHB2 serait le reflet du potentiel de développement des œufs de poisson [739] et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le taux d'expression des 2 prohibitines diminue progressivement jusqu'à un facteur 5 durant la vie de la cellule [740].

#### 1. PHB2 et infection virale.

Trois études suggèrent une implication du complexe PHB1/PHB2 dans l'infection virale. PHB2 interagit avec une protéine du virus SARS-CoV (« severe acute respiratory syndrome coronavirus »), suggérant que cette protéine modifierait la signalisation intracellulaire de l'hôte durant l'infection [741]. De plus, la liaison des PHBs au domaine C-terminal cytoplasmique (Env-CT) de la glycoprotéine du virus HIV-1 serait importante pour la réplication du virus dans les cellules non permissives [672]. Enfin, la présence du prion de la levure dans le cytoplasme de celle-ci induit la synthèse des PHBs qui s'agrègent dans le cytosol et donc diminuent leur concentration mitochondriale. Cet effet réduit entre autres la stabilité de la cyclooxygénase 2 [742].

#### 2. PHB2 et différenciation musculaire.

Depuis peu, PHB2 a également été impliqué dans la différenciation des cellules musculaires. PHB2 agit comme un répresseur transcriptionnel en interagissant avec MyoD et MEF2, 2 facteurs de transcription stimulateurs de la différenciation, ce qui réprime la transcription de gènes de différenciation dont la myogénine. Or, en conditions physiologiques

le taux de PHB2 diminue durant la différenciation musculaire et est inversement corrélé avec le taux d'Akt2.

Les études ont montré qu'Akt2, et non Akt1, interagit au niveau de son domaine C-terminal avec le domaine PHB de PHB2, mais ne se lie pas à PHB1. Cette interaction est également impliquée dans l'effet de PHB2 sur la différenciation des myoblastes : Akt2 se lie à PHB2, réduisant la liaison de celle-ci à MyoD, induisant la transcription des gènes de différenciation sous l'influence de MyoD. Akt2 joue un rôle précoce dans la sortie du cycle cellulaire et dans la différenciation myogénique, et cette fonction implique son interaction spécifique avec PHB2 [673,743].

### 3. PHB2 dans la mitochondrie.

Dans la mitochondrie, PHB1 et PHB2 s'assemblent en une structure macromoléculaire circulaire à la membrane interne de la mitochondrie [735,744]. Ce complexe est impliqué dans divers processus cellulaires, de la biogenèse mitochondriale à la mort cellulaire. En particulier, les prohibitines (PHBs) sont essentielles à la morphologie de la mitochondrie : leur absence mène à une augmentation des ROS, à une morphologie anormale des cristae (compartiments internes formés par la membrane interne de la mitochondrie), désorganise les nucléoïdes mitochondriaux, et sensibilise la cellule aux stimuli proapoptotiques. Notamment, une de leurs fonctions clé est la régulation de la GTPase OPA1, acteur clé de la formation des cristae [732,745,746].

De plus, le complexe PHB1/PHB2 phosphorylé est requis pour l'homéostasie de la mitochondrie et pour la survie des lymphocytes T [747]. Chez la levure, PHB1 et PHB2 sont impliqués dans la durée de vie de la cellule et la sénescence de fibroblastes s'accompagne d'une diminution du taux des PHBs [748,749]. Les PHBs régulent le renouvellement de protéines membranaires par une action négative sur l'activité de la protéase mitochondriale m-AAA [749]. Récemment, Kasashima *et al.* a démontré l'implication de PHB2 mitochondriale dans l'apoptose. Le complexe PHBs comporte également les protéines VDAC2 (« voltage-dependent anion channel 2 »), ANT2 (« adenine nucleotide translocator 2 ») ainsi qu'un nouveau partenaire de PHB2, la protéine anti-apoptotique Hax-1. Dans les cellules HeLa, l'extinction de PHB2 aboutit à une apoptose dépendante des caspases *via* une régulation négative de Hax-1 ainsi qu'une fragmentation de la mitochondrie [675]. PHB2 pourrait être une molécule couplant directement les interactions entre le noyau et le cytoplasme et couplant la prolifération cellulaire avec la morphogénèse mitochondriale.

#### 4. PHB2 est un régulateur des activités oestrogéniques.

Une des premières études sur PHB2 a défini celle-ci comme une protéine corégulatrice spécifique du récepteur aux œstrogènes (ER), nommée REA pour « repressor of estrogen activity » [678]. PHB2 est recrutée au récepteur lié à son ligand et est capable de diminuer l'activité transcriptionnelle d'ER lorsque celui-ci est directement lié à l'ADN ou lorsqu'il interagit avec d'autres facteurs de transcription. La partie C-terminale de PHB2 est impliquée dans cette interaction, cependant la région requise pour la répression de l'activité est différente [671,750].

Par son rôle de répresseur du récepteur aux œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ), PHB2 est un modulateur physiologique de la glande mammaire. En effet, un taux de production défini est requis pour le maintien de l'activité normale d'ER $\alpha$  et le développement normal de la glande mammaire. L'importance des PHBs dans le tissu mammaire a été démontrée par l'ablation d'un seul allèle chez les souris : l'hétérozygotie induit des changements morphologiques des glandes mammaires associés à une augmentation significative de la prolifération et des activités transcriptionnelles d'ER [736,738]. Une réduction ou une perte des fonctions de PHB2 peut causer une suractivation d'ER $\alpha$  et augmenter le risque de cancer du sein chez l'Homme [736]. Ces études montrent l'importance de PHB2 dans la régulation de la réponse aux œstrogènes. Néanmoins les mécanismes mis en jeu dans cette régulation sont mal connus : PHB2 se lie et recrute HDAC1 et HDAC5 afin de réprimer la transcription d'ER $\alpha$  [634]. De plus, PHB2 agit en modulateur du rétrocontrôle négatif exercé sur le récepteur TRPM6, impliqué dans la régulation du magnésium intracellulaire, probablement en réponse aux hormones magnésiotropiques comme l'EGF et les œstrogènes [751,752].

L'activité de corépresseur de PHB2 est régulée par sa liaison avec ER $\alpha$ . La prothymosine alpha (PT $\alpha$ ) est une protéine de remodelage de la chromatine et est requise pour la croissance et la survie cellulaire. PT $\alpha$  stimule spécifiquement l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  en séquestrant PHB2, ce qui inhibe son interaction avec ER $\alpha$ , permettant la coactivation du récepteur entre autres par SRC-1 [753-755]. De plus, l'interaction PHB2-ER $\alpha$  est également régulée par BIG3 (« brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 »), protéine fortement impliquée dans la signalisation oestrogénique dans les cellules cancéreuses du sein. En l'absence de BIG3, la stimulation des cellules par l'œstradiol induit la translocation de PHB2 vers le noyau et augmente l'interaction entre PHB2 et l'ER $\alpha$ . En présence de BIG3, PHB2 est séquestrée dans le cytoplasme induisant une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . La surexpression de BIG3 est un des mécanismes causant

l'activation de la voie oestrogénique dans les cancers du sein liés aux hormones [756]. De même, KLF9 (« Krüppel-like factor 9 ») serait impliqué dans la régulation du taux nucléaire de PHB2 dans les cellules épithéliales et du stroma utérin traitées à l'œstradiol [757]. Enfin, Umanskaya *et al.* a montré l'interaction entre Skp2B et PHB2 ainsi que la diminution du taux de PHB2 induit par la surexpression de Skp2B [758]. La régulation de PHB2 semble donc être essentiellement liée à sa capacité à se lier à des protéines qui la séquestrent, empêchant son interaction avec ER $\alpha$ , notamment par une relocalisation cytoplasmique de la protéine.

## 5. Implication dans le cancer.

PHB2 semble donc être un important régulateur de la réponse des cellules aux œstrogènes et au vu de ces études, PHB2 nucléaire pourrait être considéré comme un suppresseur de tumeur. Les prohibitines, PHB1 et PHB2, sont associées avec divers types de cancer dont les cancers du sein et du colon [744] et de forts taux sont détectés dans les tumeurs primaires [748]. De plus, les promoteurs des gènes PHB possèdent des sites de liaison pour l'oncogène Myc et la surexpression de celui-ci induit leur expression [735]. PHB2 est impliqué dans la prolifération cellulaire par sa fonction essentielle dans la mitose : il est requis lors de la protection de la cohésion des centromères contre la phosphorylation par Plk1 durant la phase précoce de la mitose [275].

Le récepteur aux œstrogènes traduit les effets stimulateurs des œstrogènes et les effets inhibiteurs des anti-œstrogènes comme le tamoxifène dans les cellules cancéreuses du sein et dans d'autres cellules-cibles des œstrogènes. Les gènes induits par le récepteur aux œstrogènes comme le récepteur à la progestérone et la cycline D1 jouent un rôle essentiel dans la morphogénèse, la fonction et la carcinogénèse des glandes mammaires. Alors que Murphy *et al.* montre que le taux d'ARNm de PHB2 n'est pas différent entre les tumeurs du sein et les cellules normales [759], Simon *et al.* démontre que le taux d'expression de PHB2 est associé avec le degré de différenciation des cancers du sein. Précisément, PHB2 est inversement corrélé au grade tumoral. L'expression varie selon les tumeurs du sein et est corrélé avec des marqueurs connus de réponse aux traitements et inversement corrélé avec un marqueur de la progression du cancer du sein [679]. En étudiant l'expression des gènes en réponse à l'œstradiol et au genistein dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, Parker *et al.* a montré que *CDK1NA* et *PHB2* étaient régulés positivement dans la lignée traitée Oy-1 alors que seul *PHB2* était régulé négativement dans la lignée Br-1 [760].

Néanmoins, il semble que PHB2 soit bien impliquée dans les cancers, même si ses fonctions sont ambiguës. L'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes est positivement liée à la progression tumorale dans les cellules sensibles aux œstrogènes. De ce fait, PHB2 pourrait avoir un rôle de suppresseur de tumeur. Cette hypothèse semble confirmée par les travaux d'Umanskaya *et al.*, qui démontrent l'interaction entre Skp2B et PHB2. Bien que ses fonctions soient inconnues, Skp2B est fréquemment surexprimée dans les cancers du sein. Or cette surexpression diminue le taux de PHB2 cellulaire [758]. De plus, la capsaïcine, agent anticancéreux, se lie à PHB2, induit sa translocation vers le noyau et induit une apoptose directement au niveau mitochondrial à laquelle PHB2 contribue à plusieurs niveaux [676]. Cependant, dans les tissus colorectaux normaux et tumoraux, l'expression du récepteur aux œstrogènes bêta (ER $\beta$ ) est corrélée avec celle de PHB2, suggérant un rôle essentiel d'ER $\beta$  et de ses corégulateurs dans le développement des carcinomes colorectaux [761]. De même, la protéine EZH2 (« enhancer of zeste homolog 2 »), impliquée dans la différenciation et la progression des cancers du sein et de la prostate, réprime la transcription dépendante des œstrogènes, comme PHB2. Ces 2 protéines interagissent entre elles et leurs répressions sont interdépendantes [762]. Enfin, parmi les gènes dont l'expression est modulée par l'ER $\alpha$ , BTG2 (“B-cell Translocation Gene 2”) est un gène suppresseur de tumeur dont l'expression est significativement réduite dans les carcinomes du sein traités avec de l'œstradiol. Or, la délétion de PHB2 annihile la répression de la prolifération induite par BTG2. La capacité du complexe œstradiol-ER $\alpha$ -PHB2 de supprimer l'expression de BTG2 indique un rôle positif de ce corépresseur dans la prolifération des cellules du sein [674].

## II. Objectifs de l'étude.

L'équipe de recherche du centre de lutte contre le cancer Paul Papin à Angers se focalise sur l'étude de protéines régulatrices de la prolifération cellulaire tumorale ainsi que sur les mécanismes moléculaires de résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies. Comme nous l'avons vu précédemment, p21 est une protéine dont les fonctions sont pleiotropes et de ce fait elle est un régulateur clé de nombreux processus. Cependant, les déterminants menant aux fonctions de p21 dans une voie plutôt que dans une autre sont mal connus ; c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la mise en évidence de nouveaux partenaires.

La découverte d'une interaction entre p21 et PHB2 ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de PHB2 et de p21. PHB2 aurait un rôle complexe au cours des processus

tumoraux et ses fonctions semblent être intrinsèquement liées à sa localisation subcellulaire. Dans le noyau, PHB2 agirait en tant que molécule corégulatrice et majoritairement mènerait à la répression de la transcription du gène cible. Une étude protéomique de tumeurs du colon par la technique « iTRAQ » (« isobaric tag for relative and absolute quantitation ») a montré une surexpression de PHB2 par rapport aux tissus sains, quelque soit le type de tumeurs (communication personnelle, travaux réalisés par Anthony Bourreau et Catherine Guette, Inserm U892, centre Paul Papin, Angers). PHB2 pourrait ainsi participer au moins indirectement à la tumorigenèse. Le complexe p21/PHB2 pourrait donc être important lors des processus tumoraux. L'étude de ce complexe a donc été réalisée dans les cellules cancéreuses colorectales d'une part afin de comprendre le rôle de PHB2 en lien avec les fonctions de p21 et d'autre part afin de mettre en évidence de nouveaux aspects des fonctionnalités de p21.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la description de l'interaction entre p21 et PHB2. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis présenté ci-après. En second lieu nous avons cherché à comprendre le rôle du complexe p21/PHB2 dans les cellules tumorales colorectales. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps travaillé sur l'implication de PHB2 dans la prolifération tumorale puis dans l'expression d'un oncogène cellulaire, c-myc, qui module l'expression de p21 mais qui est également régulé par p21. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet de PHB2 sur le métabolisme de p21. Ces travaux sont présentés dans les résultats supplémentaires.

III. Article en soumission (« short communication ») pour une publication dans « FEBS letters ».

## **The cell cycle inhibitor p21 interacts with the transcriptional coregulator PHB2.**

**Marie-Laure Gervais, Olivier Coqueret and Eric Lelièvre**

### **Abstract**

p21 is a potent cyclin/cdk complexes inhibitor and a key regulator in many process involved in tumorigenesis. But it remains unclear how p21 during apoptosis and differentiation acts. Here we demonstrate the direct interaction between p21 with PHB2 in nucleus. In nucleus PHB2 acts as a transcriptional corepressor involved in apoptotic, proliferative and differentiation controls. Mapping the interaction shows that cyclin/cdk region of p21 binds to PHB domain of PHB2. Overall, this study defines a novel protein complex which could maybe have other partners and acts as transcriptional coregulator. Future studies will explore p21-PHB2 functions and the cell process involved.

**Keywords** : p21, PHB2, two-hybrid, Cancer, protein interaction

**Abbreviations:** PHB2: prohibitin-2, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, cdk: cyclin-dependent kinase, REA: repressor of estrogens activity, IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, WB: western blot. wt: wild-type. aa: amino acids.

## Introduction

Protein-protein interactions regulate all processes in the cell and are major goals especially in cancer therapeutics research. p21<sup>waf1/cip1</sup> (p21), is a key negative regulator of proliferation inhibiting cell cycle and DNA synthesis inhibition [559] and is frequently down-regulated in cancers. It acts on almost all cellular process, but its functions in some pathways remain unclear, especially during apoptosis, where it could act as well as a stimulator or a repressor. It could also stimulate proliferation under specific conditions [110]. Dong *et al.* suggests that p21 subcellular localisation is involved in determining p21 function, and define p21 as an essential pivot leading cell to enter in a specific pathway [763].

We performed bacterial two-hybrid screen to identify novel partners of p21. One candidate isolated was prohibitin 2 (PHB2). PHB2, also called repressor of estrogens activity (REA), is a highly conserved protein with a pleiotropic localisation. It belongs to the prohibitin superfamily, which distinguishes by presence of a common domain, named PHB. PHB2 is essential for mitochondria homeostasis [745] but is involved in apoptosis [764], differentiation [673] or mitosis [275]. Nuclear PHB2 acts as a co-regulator of transcription [677]. Nevertheless, the role of PHB2 during apoptosis and differentiation isn't clear. Given these function related to tumorigenesis and because PHB2 was found overexpressed in colorectal cancer tissues from patients (personal communication), we chose this putative partner of p21 to further studies.

This study defines an interaction between p21 and PHB2 and may underscore a putative function for this complex.



Total proteins were extracted from cell with lysis buffer (Hepes pH7,9 25mM, KCl 300mM, EDTA 0,2 mM, glycerol 10%, NP40 1%, aprotinin 5µg/ml, leupeptin 2µg/ml, pepstatin 0,1µg/ml, PMSF 1µM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 5mM) for 30min at 4°C, centrifuged at 13000xg for 10min and supernatant was immediately used.

#### Bacterial two-hybrid.

Screening was performed using the Bacteriomatch II Two-Hybrid System kit according to manufacturer's instructions. Target's sequences were isolated, identified by sequencing and putative interacting proteins were identified using a megablast ([www.ncbi.org](http://www.ncbi.org)). Validation of the interaction was performed by cotransforming isolated recombinant plasmids into the appropriate strain. Several dilutions of the bacterial suspension were plated on dual selective medium and allowed to grow up for 24h at 30°C.

#### Pull down assay and Immunoprecipitation.

Pull-down assays were performed using recombinant purified GST-tagged or polyhis-tagged protein as bait and target or using whole cell extract as target. Extraction and batch purification were performed using GST-bind or His-bind purification kits (EMD chemicals Inc.). For cell extract as target, whole cell extract was precleared with resin used for bait purification.

For immunoprecipitation, cell extract was precleared and then appropriate specific or control antibody was added overnight at 4°C. Protein A-agarose beads were added to the mixture before western blot analysis. Pull-down assays, immunoprecipitation and western blot analysis were performed as described previously [291].

### Immunofluorescence.

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15min at room temperature, permeabilized with 0,2% tritonX100 for 5min, blocked with 1% BSA and 5µg/ml primary antibodies against p21 and PHB2 were exposed to cells overnight at 4°C. Cells were treated with fluorescent secondary antibodies for 1h at 37°C in the dark, following by treatment with 1mg/ml RNase for 20min and nuclei were labelled by Dapi 1µg/ml for 1 min. Cells were mounted on slides and fluorescence was read using epifluorescence microscope. Images were captured with a 10x objective with a 100x optical zoom. Final images were adjusted for brightness and contrast.

## Results and Discussion.

### Interaction of PHB2 with p21.

To identify novel partners of p21, we performed a bacterial two-hybrid screen using the p21 as bait and a cDNA library from LS180 as target. Among clones carrying sequences coding proteins, two clones encoding different sequences of PHB2, named A and B, were isolated. Each purified clone was cotransformed with purified p21 clone to validate the results. Transformed bacteria grew up on non selective and selective media and control transformations were realised in parallel in the same manner (fig. 1). Both co-transformations with PHB2 clones show a significant association between p21 and PHB2 in bacteria. We confirmed it by pull-down assays using cell lysate or purified polyhistidine-tagged PHB2. Wild-type recombinant p21 binds native and recombinant PHB2 (fig. 2), establishing that the interaction occurs directly *in vitro*.

### Mapping the interaction.

Clone A encode PHB2 amino acids (aa) 86 to 298 and clone B encode PHB2 aa 1 to 218. Bacteria carrying clone B grow up faster, showing the interaction is stronger with it. These sequences show that aa 86 to 218 define p21 binding domain. PHB2 contains a N-terminus transmembrane domain (aa 1-36), a central domain named PHB (aa 68-195) and a C-terminus coiled-coil domain (aa 200-265). p21-interacting domain covers almost all PHB domain; clone B carrying all this domain, instead of clone A, so we can conclude that p21 interacts with PHB domain of PHB2, that integrity of PHB domain or the N-terminus domain aren't necessary for the interaction but seem to be important.

We then mapped the domain of p21 bound to PHB2 using pull down assays with p21 mutants. Three p21 mutants were used (fig. 3A). p21 mutant C lacks the C-terminus half containing PCNA-binding domain and is able to interact with native and recombinant PHB2 (fig. 3B-C). Mutant F lacks the N-terminus half containing a cyclin-binding domain and mutant G contains only the PCNA-binding domain (fig. 3A). Native and recombinant PHB2 bind p21F mutant but not G mutant, attesting that PCNA-binding domain isn't involved (fig. 3B-C). Nevertheless, PHB2-p21F interaction is less important than PHB2-p21C interaction, suggesting PHB2 mainly interact with N-terminus cyclin-binding domain of p21. We confirmed this performing pull down assay between p21 and cyclin B with or without PHB2 (fig. 3D) using cell extract as source of cyclin B. Cell treatment with nocodazole 50ng/ml for 18h induce cyclin B overexpression. Under physiological conditions, there is less cyclin B bound to p21 when p21 is preincubated with PHB2. On the contrary there are no significant differences under nocodazole treatment. These results demonstrate a competition between cyclin B and PHB2 for p21, confirming PHB2 interacts with p21 in the area of cyclin B binding domain.

#### Subcellular localisation.

PHB2 and p21 were labelled with specific antibodies in HEK293 and HT1080 and detected with fluorescence (fig. 4). In both cell lines, proteins are localised mostly in nucleus. However, there are some differences. In HEK293 (fig. 4 left panel), PHB2 is apparently localised only in nucleus and seems to be bound to the chromatin in a uniform manner, whereas p21 is also in cytoplasm. Nuclear p21 appears as granules bound at chromatin's specific areas. In HT1080 (fig. 4 right panel), PHB2 is located only in nucleus but its localisation is more homogeneous. p21 is essentially located in

nucleus but there is a part of p21 in cytoplasm too. Cytoplasmic and nuclear p21 form halos around nuclear membrane.

So we could hypothesized the interaction occurs at chromatin's specific areas; suggesting a function in gene transcription regulation. This hypothesis is relevant because p21 and PHB2 can function as transcriptional coregulators [292,677].

#### *In vivo* coimmunoprecipitation.

Finally the presence of p21-PHB2 complex *in vivo* was confirmed performing a coimmunoprecipitation using cell lines lysates where p21 and PHB2 are expressed (fig. 5). Interestingly, PHB2 is present in immunoprecipitates of p21 in HT1080 and in LS180 but not in HCT116. Conversely there is no p21 detection in PHB2 immunoprecipitates in the first cell lines while it's detected in HCT116 (fig. 5). So PHB2 presence after p21 precipitation differs depending on colorectal cell line, suggesting a possible involvement of another interacting partner, which remains to be identified. We hypothesised this third partner could be prohibitin 1 (PHB1). In fact, PHB2 and PHB1 have highly similar sequences and can form heterodimer [672,747]. Moreover, PHB1 is considered as a tumour suppressor able to bind different nuclear protein as ER $\alpha$  or p53 [730,765,766] and both proteins separately bind RNF2 and ER $\alpha$  to repress gene transcription [678,764,767], but PHB1/PHB2 complex can bind ER $\alpha$  too [738].

These results demonstrate for the first time the interaction between p21 and PHB2, which occurs *in vitro* and *in vivo* in several cancer cell lines. One potential role of PHB2 may be to recruit p21 on gene promoters to modulate the transcription. PHB2 represses ER $\alpha$  transcriptional activity by recruiting histone deacetylases [677]

and is linked to many processes like apoptosis or differentiation. When PHB2 is translocated from mitochondria to nucleus, it functions on apoptosis control by disturbing mitochondrial inner membrane [676] or on muscle differentiation by binding the transcription factor myoD [673]. In parallel, p21 regulates transcription of mitogenic factors and acts on differentiation [110]. We hypothesised that PHB2-p21 complex could be a transcriptional coregulator which repress mitogenic factors. Future studies should explore the role of PHB2 in p21 functions, especially in p21-dependent gene expression regulation.

### **Acknowledgments.**

This research was supported by Inserm U892, Angers, France sponsored by the French Anticancer League Association. We thank R. Fotedar for giving us clones carrying p21 wild-type and mutants sequences.

## References.

- [1] Coqueret, O. (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology* 13, 65-70
- [2] Abbas, T. and Dutta, A. (2009) p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews. Cancer* 9, 400-414
- [3] Dong, Y., Chi, S.L., Borowsky, A.D., Fan, Y. and Weiss, R.H. (2004) Cytosolic p21Waf1/Cip1 increases cell cycle transit in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling* 16, 263-269.
- [4] Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.-C., Waisman, A., Westermann, B. and Langer, T. (2008) Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes & Development* 22, 476-488.
- [5] Lee, S.-J., Choi, D., Rhim, H., Choo, H.-J., Ko, Y.-G., Kim, C.G. and Kang, S. (2008) PHB2 interacts with RNF2 and represses CP2c-stimulated transcription. *Molecular and Cellular Biochemistry* 319, 69-77.
- [6] Héron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J.C. and Fernandez, A. (2008) Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *Journal of Cellular Physiology* 214, 158-165.
- [7] Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ma, N., Kurihara, D., Ono-Maniwa, R., Nakagawa, M., Azuma, T., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2007) PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Current Biology: CB* 17, 1356-1361.
- [8] Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V. and Seiser, C. (2004) Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity

- via recruitment of histone deacetylases. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 24834-24843.
- [9] Barré, B., Vigneron, A. and Coqueret, O. (2005) The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 15673-15681.
- [10] Vigneron, A., Cherier, J., Barré, B., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2006) The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 34742-34750.
- [11] Emerson, V., Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Wang, I.H., Schnölzer, M., Kempf, T. and Bosch, V. (2009) Identification of the cellular prohibitin 1 and 2 heterodimer as interaction partner of the C-terminal cytoplasmic domain of the HIV-1 glycoprotein *Journal of Virology*.
- [12] Ross, J.A., Nagy, Z.S. and Kirken, R.A. (2008) The PHB1/2 phosphocomplex is required for mitochondrial homeostasis and survival of human T cells. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 4699-4713.
- [13] Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B. and Chellappan, S. (2003) Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 47853-47861.
- [14] Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J. and Chellappan, S.P. (2002) Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene* 21, 8388-8396.

- [15] Wang, S., Nath, N., Fusaro, G. and Chellappan, S. (1999) Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7447-7460.
- [16] Choi, D., Lee, S.J., Hong, S., Kim, I.H. and Kang, S. (2008) Prohibitin interacts with RNF2 and regulates E2F1 function via dual pathways. *Oncogene* 27, 1716-1725.
- [17] Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P. and Katzenellenbogen, B.S. (1999) An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6947-6952.
- [18] He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D.M., DeMayo, F.J., Katzenellenbogen, B.S., Lydon, J.P. and O'Malley, B.W. (2008) A repressive role for prohibitin in estrogen signaling. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22, 344-360.
- [19] Kuramori, C., Azuma, M., Kume, K., Kaneko, Y., Inoue, A., Yamaguchi, Y., Kabe, Y., Hosoya, T., Kizaki, M., Suematsu, M. and Handa, H. (2009) Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 519-525.

## Figure legends.

**Fig 1. Validation of the interaction.** A co-transformation with purified clone A or B of PHB2 and p21 clone was realised to validate results in bacteria. Bacteria were plated on non selective and selective media at the same descending concentrations (arrow):  $1,6 \times 10^6$ ,  $0,8 \times 10^6$ ,  $0,4 \times 10^6$ ,  $0,2 \times 10^6$  and  $0,1 \times 10^6$  bacteria per  $\mu\text{l}$ . Controls were performed in parallel: LGF2 and Gal<sup>11P</sup> cotransformation as positive control, transformations with either Gal<sup>11P</sup> or with Gal<sup>11P</sup> and p21 as negative controls.

**Fig 2. PHB2 directly binds p21.** (Upper panel) Beads with bound GST or p21-GST were incubated with 5mg LS180 whole cell extract. PHB2 binding was analysed using PHB2 immunoblot. Lysate represents 50 $\mu\text{g}$  cell extract. (Middle panel) Beads with bound GST or p21-GST were incubated with 1 $\mu\text{g}$  recombinant PHB2-his. Direct binding of PHB2 to p21 was analysed by polyhistidine immunoblot. PHB2-his on right represents 50ng. (Lower panel) Beads with bound PHB2-histidine were incubated with eluted p21-GST or GST and p21 binding was analysed by p21 immunoblot. p21-GST on right represents 50ng.

**Fig 3 PHB2 interacts with p21 N-terminus.** (A) p21 mutants were used to define PHB2 binding domain. (B-D) Pull down assays. (B) Beads with bound GST, p21-GST wild-type, C, F, or G were incubated with 5mg LS180 cell extract. PHB2 binding was analysed using PHB2 immunoblot. Input represents 50 $\mu\text{g}$  of cell extract. (C) Beads with bound GST, p21-GST wt or mutants were incubated with 2.5 $\mu\text{g}$  tagged polyhistidine PHB2. PHB2 binding was analysed using PHB2 immunoblot. Input represents 250ng of tagged PHB2. (D) Beads with bound p21wt-GST were pre-incubated or not with 2,5 $\mu\text{g}$  tagged polyhistidine PHB2. Then cell extract treated or

not with nocodazole 50ng/ml for 18h was incubated with p21wt-GST-PHB2-his or p21wt-GST. Cyclin B binding was analysed using cyclin B immunoblot. PHB2 and cyclin B controls were used to assess PHB2 and cyclin B presence.

**Fig 4 PHB2 and p21 are nuclear.** p21 and PHB2 were stained with mouse anti-p21 and rabbit anti-PHB2 antibodies, respectively, or with appropriate IgG as negative controls. Proteins were then labelled with anti-mouse-TRITC conjugated and anti-rabbit-FITC conjugated antibodies, respectively, and fluorescence was detected. Nuclei were stained with Dapi. (A) HEK293 cell line was cultured in physiological conditions. (B) HT1080 cell line. p21 was induced for 24h with 50 $\mu$ M IPTG.

**Fig 5. Interaction *in vivo*.** Coimmunoprecipitation were realized from whole cell extract on different cancer cell lines. Immunoprecipitation using rabbit immunoglobulin G whole molecule was used as negative control. p21 in HT1080 cell line was induced by IPTG 50 $\mu$ M addition for 24h. Immunoprecipitation and immunoblot were realized using rabbit anti-p21 or rabbit anti-PHB2 antibody. LS180 cell line was treated or not with SN38 10ng/ml for 48h to overexpress p21. Coimmunoprecipitation were realized on treated or untreated whole cell extract, precipitation and immunoblot were performed using appropriate antibodies. Lysate represent 50 $\mu$ g precleared cell extract. IP: immunoprecipitation.

Tables and figures.

Figure 1

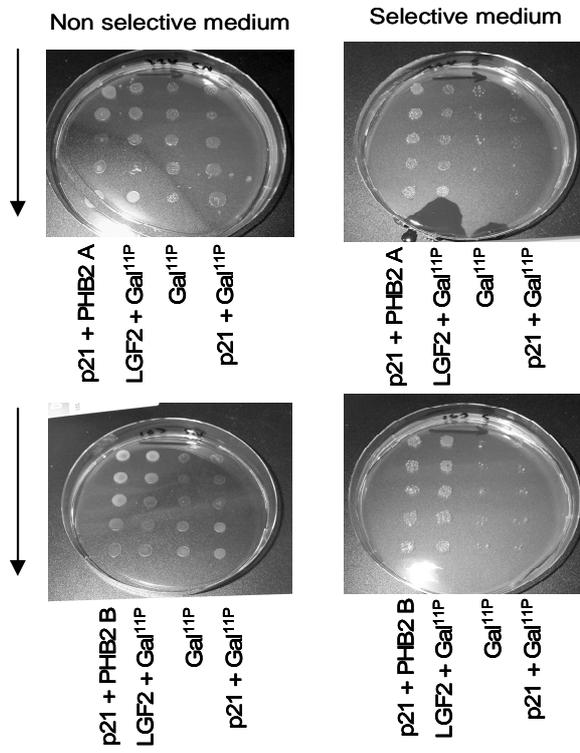


Figure 2:

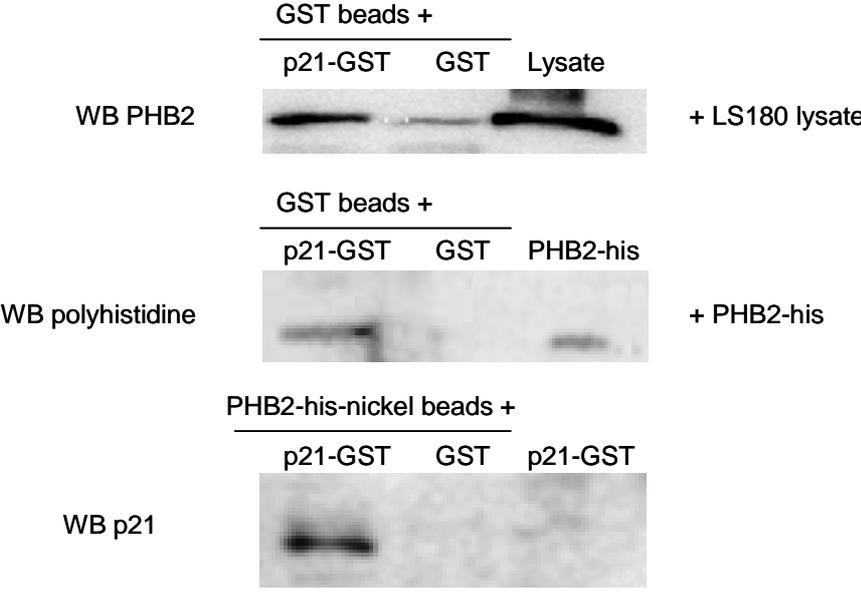
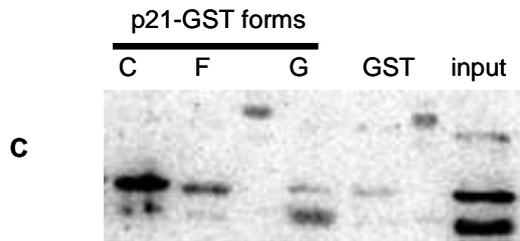
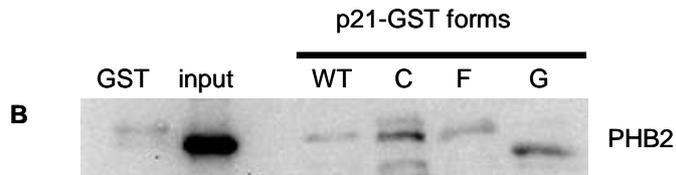


Figure 3



p21-GST	+	+	-	-	+	+	-	-
PHB2-his	-	+	+	-	-	+	+	-
cyclin B (cell extract)	+	+	-	+	+	+	-	+
nocodazole 50ng/ml 18h	+	+	-	+	-	-	-	-



Figure 4

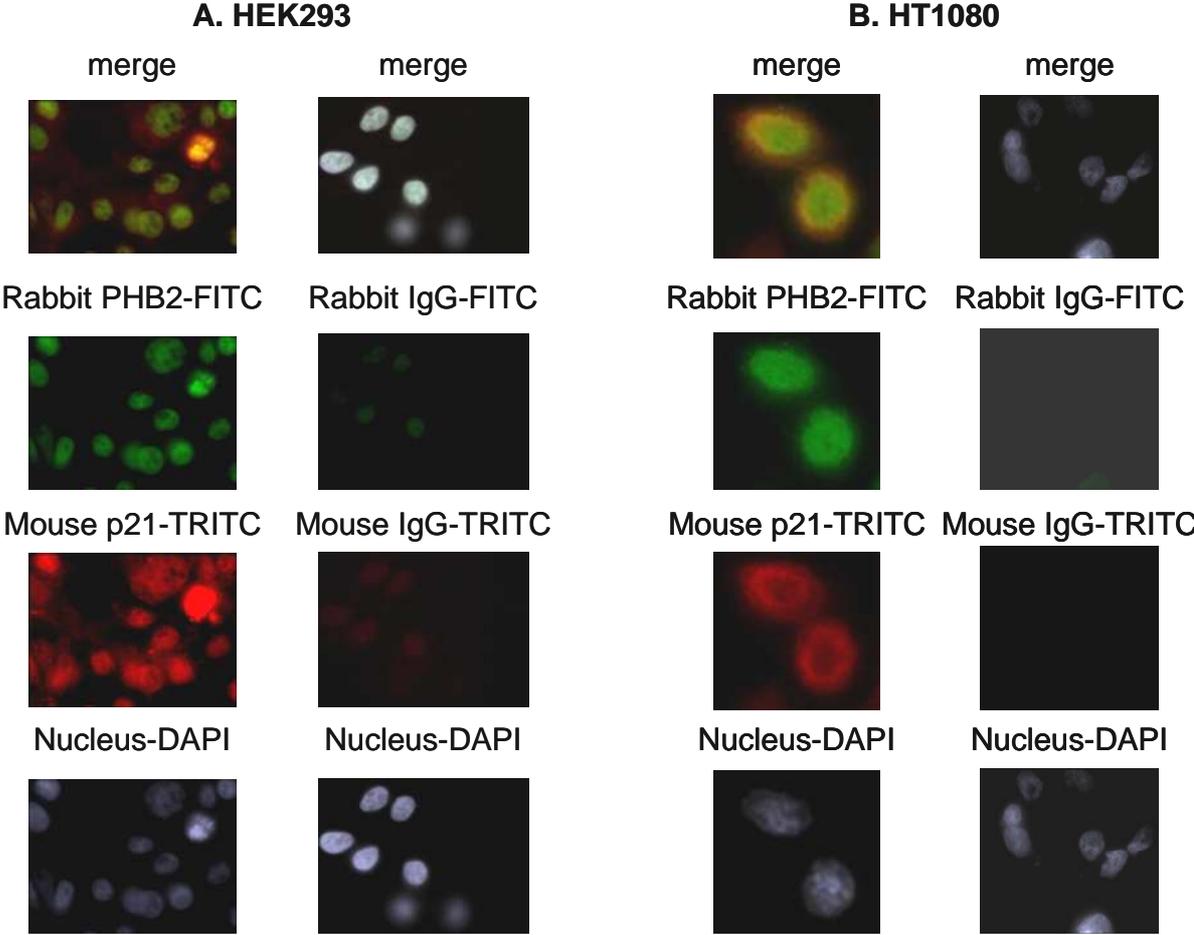
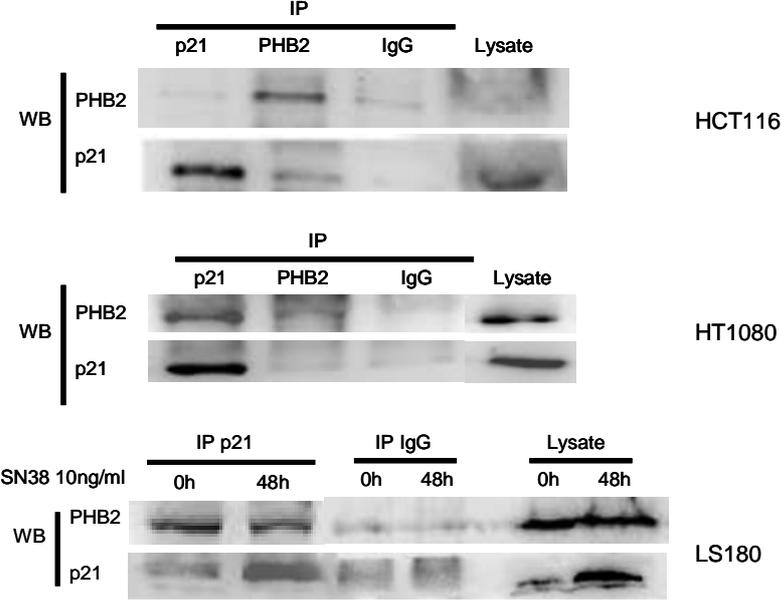


Figure 5



#### IV. Résultats supplémentaires.

##### 1. Matériels et Méthodes.

La lignée cellulaire utilisée ici est la lignée HEK293, pour “Human Embryonic Kidney 293”, mises en culture dans un milieu DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal à une concentration finale de 10%. Les cellules sont mises en culture à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub>. Sauf mention contraire, les réactifs utilisés proviennent des fournisseurs Promega pour le clonage et Sigma-Aldrich pour les produits chimiques. Les anticorps proviennent de Santa Cruz Biotechnology et les milieux cellulaires de Lonza.

###### a. Analyse de l’expression génique.

Après culture et traitements des cellules, l’extraction des ARN totaux est réalisée conformément au protocole du réactif TriReagent (Ambion Inc.). Les ARNs sont incubés 3 min à 70°C avec des amorces spécifiques de la transcription inverse (« random primer », Invitrogen Corp.) puis la réaction de rétrotranscription est réalisée à 37°C pendant 1h suite à l’ajout des réactifs suivants : dNTPs 0,4μM, RNAsout 1U, MMLV-RT 1U.

Les ADNc codant les protéines PHB2 et GAPDH sont amplifiés par PCR en temps réel avec des amorces spécifiques ne pouvant s’hybrider sur de l’ADN génomique de concentration finale 0,2μM (cf. annexe 3) et le réactif SybrGreen (Applied Biosystems) selon le protocole du fabricant. Les valeurs de cycle seuil obtenues (Ct : « Cycle Threshold ») sont utilisées pour la quantification relative de l’ADN. Trois répétitions biologiques de l’expérience ont été réalisées et les Ct obtenus pour chacune sont issus de la moyenne de 3 répétitions mathématiques. La quantification de l’ADN mène à l’obtention d’un facteur de variation (amplification ou répression) de l’expression du gène cible x, qui est significatif lorsque sa valeur est supérieure ou égale à 2. Afin de limiter les variations dues à la manipulation, un gène de référence, GAPDH, invariant, est utilisé. Les calculs suivants sont utilisés afin d’obtenir le facteur de variation :

Pour chaque condition (traitement et témoin) :  $\Delta Ct = Ct_{\text{gènex}} - Ct_{\text{GAPDH}}$

Puis :  $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{traitement}} - \Delta Ct_{\text{témoin}}$

Facteur d’amplification  $A = 2^{\Delta(\Delta Ct)}$

Facteur de répression  $R = 1 / (2^{\Delta(\Delta Ct)})$

b. Analyse de l'expression protéique.

Les cellules en culture sont lavées 3 fois avec du PBS, récupérées mécaniquement et centrifugées à 800xg pendant 5min à température ambiante. Le culot cellulaire est dissous dans 100µl de tampon de lyse total (cf. annexe 2), incubé 30min sur roue à 4°C et centrifugé 10min à 13 000xg à 4°C. La concentration protéique du surnageant obtenu est déterminée par dosage de Bradford : 5µl d'échantillon protéique est dissous dans 95µl d'eau, puis 150µl de reactif de Bradford dilué au 1/3 sont ajoutés. En parallèle, une gamme de concentration croissante connue d'albumine (BSA) est réalisée et les DO<sub>595</sub> sont mesurées. La concentration de l'échantillon est déterminée à partir de la pente de la gamme.

L'analyse protéique se fait ensuite par Western Blot (WB), conformément au protocole décrit dans le chapitre 1 (matériels et méthode §.III.1). Les concentrations de gel de polyacrylamide utilisées varient entre 8% et 12%, en fonction de la taille de la protéine observée, et 50µg de lysat protéique total est déposé. Les anticorps primaires utilisés, tous dilués d'un facteur 1000, sont les suivants : anticorps de lapin anti-PHB2, anticorps de lapin anti-p21, anticorps de lapin anti-c-myc, anticorps de souris anti-actine et anticorps de souris anti-HSC70. Les intensités des bandes obtenues après révélation sont mesurées par le logiciel « Quantity One 1D » et quantifiées en pourcentage de volume les unes par rapport aux autres.

c. Traitements des cellules et analyse des westerns blots.

Les cellules en culture sont transfectées avec les plasmides adéquats par le système lipofectamine. Après traitement, les protéines sont extraites et analysées par western blot. La quantification se fait par mesure des intensités relatives des bandes obtenues par le logiciel Quantity One.

Dans le cas de l'inhibition du protéasome, après 24h de transfection les cellules sont traitées avec une solution de MG132 à 5µM pendant 12h (Sigma-Aldrich). Les intensités des bandes du western sont mesurées 2 par 2 par le logiciel Quantity One et définies en pourcentage de volume l'une par rapport à l'autre : la comparaison est faite entre les intensités obtenues pour la transfection de p21 seule entre les cellules traitées et non traitées. Il en est de même pour les intensités obtenues après cotransfection de PHB2 et de p21. Pour chaque transfection, le facteur d'augmentation est calculé entre l'intensité de la bande correspondant au taux de c-myc dans les cellules traitées et cette même intensité dans les cellules non traitées. Ce facteur d'augmentation est exprimé en pourcentage de l'intensité dans le cas des cellules non traitées.

Dans le cas de l'analyse de l'expression de l'oncogène c-myc, les intensités des bandes obtenues sont quantifiées par le logiciel en pourcentage de volume les unes par rapport aux autres. L'analyse des résultats a été faite en quantifiant les intensités relativement à celle obtenue dans le cas des cellules non transfectées.

d. Transfection transitoire dans les cellules HEK293.

Le plasmide recombinant pRSV-p21 et le contrôle correspondant sont des présents de ?. Le clonage de la séquence codante de PHB2 a été réalisé dans le plasmide pcDNA4/T0 (Invitrogen) selon le protocole suivant. La matrice d'ADN, constituée des ARNm purifiés de la banque d'ADNc humains (30ng, cf. chapitre 1) est incubée avec le mélange réactionnel suivant pour amplifier la séquence codante de PHB2 par PCR et insérer les nucléotides nécessaires au clonage et à l'expression dans les cellules : ARNm 30ng, dNTPs 0,4μM, amorce sens et antisens 0,4μM de chaque (cf. annexe 3), GoTaq polymérase 5U. Les cycles de PCR sont les suivants : 1 x (94°C 1min), 8 x (94°C 30sec + 58°C 30 sec + 72°C 2min20) et 27 x (94°C 30sec + 62°C 30 sec + 72°C 2min20). Le produit obtenu est digéré par les enzymes de restriction EcoRI et XbaI (2U chaque) pendant 2h à 37°C, purifié et inséré dans le vecteur pcDNA4/T0 également digéré et purifié. L'insertion se fait par ajout de T4 DNA ligase (3U) et incubation à 4°C sur la nuit. Le produit de ligation est utilisé pour transformer les bactéries compétentes JM109. Les clones positifs sont amplifiés et la minipréparation d'AND plasmidique est séquencée. Le clone contenant le plasmide recombinant ne présentant pas de mutation est amplifié et conservé sous forme de glycerol stock.

Les plasmides non recombinants et recombinants sont transfectés dans les cellules HEK293 grâce au système lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp.) selon les instructions du fabricant.

e. Test de clonogénicité.

Les cellules sont cultivées en plaque 96 puits pour être transfectées. Après 24h de transfection, les cellules sont récupérées par décollement chimique (incubation dans la trypsine pendant 5min à 37°C), lavées, comptées et ensemencées en duplicat en plaque 6 puits à une densité de 1000 cellules/puit. Les cellules sont mises en culture pendant 7 jours jusqu'à la formation de colonies observables à l'œil nu dans les puits contenant les cellules non traitées. Les cellules sont lavées avec du PBS puis colorées avec une solution de cristal violet à 0,5% pendant 10min à température ambiante. Après lavages avec du PBS, les colonies sont comptées par le logiciel Quantity One.

f. FACS.

Les cellules en culture sont transfectées ou non et incubées pendant 27h. Le surnageant et les cellules récupérées comme précédemment sont centrifugés à 800xg pendant 5min à température ambiante. Le culot est repris dans du paraformaldéhyde 2% pour fixer les cellules pendant 10min à 4°C. Après centrifugation et lavage, les cellules sont incubées avec une solution de perméabilisation et de saturation (cf. annexe 2) puis l'anticorps primaire anti-PHB2 de lapin (1/50<sup>e</sup>) est ajouté pendant 1h à 4°C. L'anticorps secondaire anti-anticorps de lapin couplé au FITC (1/100<sup>e</sup>) ainsi que l'intercalant de l'ADN Dapi (5µg/ml) sont ajoutés pendant 1h à 4°C à l'obscurité. La lecture au cytomètre en flux (cf. annexe 1) se fait après dilution des cellules avec 500µl de PBS et l'analyse est réalisée par le logiciel « FACS DIVA 6 » (cf. annexe 1).

g. Immunofluorescence.

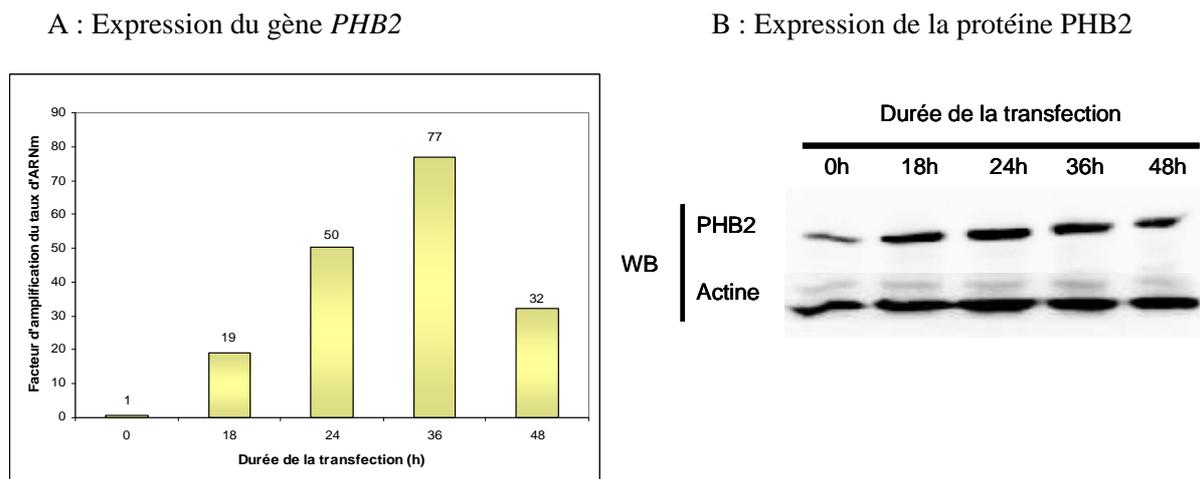
Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'article soumis (cf. chap. 3 partie 3 § III.). Les cellules en culture sur une lamelle de microscope sont transfectées pendant 24h, fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 15min à température ambiante et perméabilisées par une solution de TritonX100 à 0,2% pendant 5min à température ambiante. Après incubation dans une solution de saturation contenant 1% de BSA, les cellules sont mises en contact une nuit à 4°C avec une solution d'anticorps diluée au 1/50<sup>e</sup> contenant soit l'anticorps de souris anti-p21 et l'anticorps de lapin anti-PHB2, soit les immunoglobulines G de souris et de lapin (Sigma-Aldrich). Après lavages, les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C à l'obscurité en chambre humide avec une solution d'anticorps secondaires anti-anticorps de lapin et anti-anticorps de souris (1/500<sup>e</sup>) conjugués aux fluorochromes FITC et TRITC, respectivement. Par la suite les cellules sont traitées avec de la RNase (1mg/ml, Qiagen) pendant 20min à 37°C à l'obscurité en chambre humide et le noyau est marqué avec une solution de Dapi à 1µg/ml pendant 1min à température ambiante à l'obscurité. Après lavage au PBS, les lamelles contenant les cellules sont fixées sur les lames et la fluorescence des cellules est visualisée au grossissement 1000. Les images sont traitées uniquement pour améliorer la luminosité et le contraste (cf. annexe 1).

#### 4. Résultats.

##### a. PHB2 et prolifération cellulaire.

La construction plasmidique contenant la séquence codante de PHB2 est transfectée transitoirement par un système de vésicules lipidiques (Lipofectamine 2000, Invitrogen) dans la lignée cellulaire HEK293. L'analyse des lysats protéiques montre une augmentation croissante de la transcription du gène et du taux de protéines les 36 premières heures suivant la transfection, puis une diminution drastique après 48h (cf. figure 53). La production de PHB2 est donc rapidement régulée, laissant supposer que la surexpression de la protéine est un évènement défavorable au métabolisme cellulaire et par conséquent à la prolifération. De plus, il n'a pas été possible de sélectionner un clone exprimant de façon stable la protéine.

Figure 53 : Cinétique d'expression transitoire de PHB2 transfectée dans HEK293.

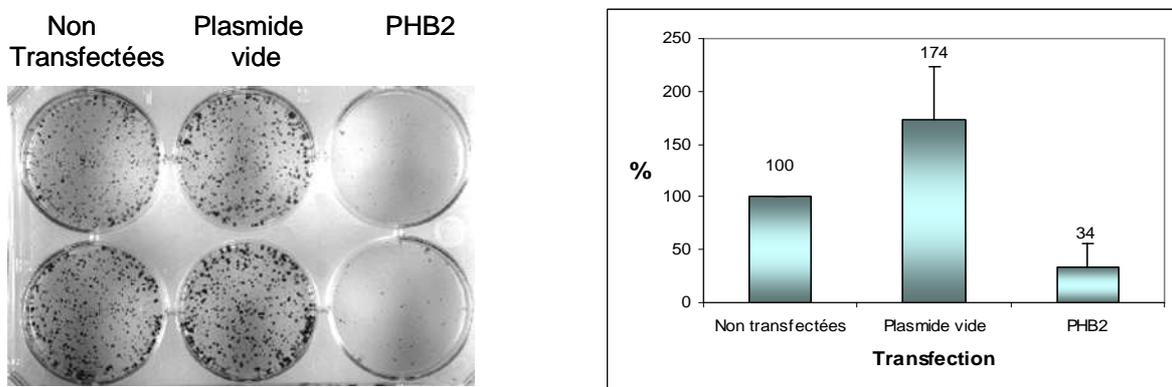


Transfection de PHB2 dans HEK293. Les cellules sont transfectées avec le complexe lipofectamine-plasmide recombinant durant 0, 18, 24, 36 et 48h. Le temps 0h correspond à la transfection du complexe lipofectamine-plasmide non recombinant et sert de contrôle. **A.** Augmentation de la transcription génique de PHB2. La surexpression de PHB2 est mesurée par le facteur d'amplification de transcrits par rapport au taux de transcrits du gène de référence *GAPDH*, significatif lorsqu'il est supérieur à 2. **B.** Augmentation du taux de protéines PHB2. Western blot à l'aide d'un anticorps anti-PHB2. Parallèlement, l'actine est mise en évidence comme contrôle de charge.

Par la suite, l'effet de la surexpression de PHB2 sur la prolifération a été analysé par clonogénicité. Les cellules transfectées pendant 12h ou non sontensemencées à une densité de 1 000 cellules par puit et incubées pendant 7 jours. Après formation de colonies

observables à l'œil nu, le nombre de colonies pour chaque condition est comptabilisé. La transfection des cellules HEK293 par le plasmide non recombinant induit un nombre de colonies similaire voire supérieur à celui observé dans le cas des cellules non transfectées. Par contre, la transfection des cellules par le plasmide PHB2 recombinant entraîne une croissance des cellules 3 fois plus faible que dans le cas des cellules non transfectées (cf. figure 54). La surexpression de PHB2, même transitoire, a donc un effet négatif important sur la prolifération des cellules HEK293.

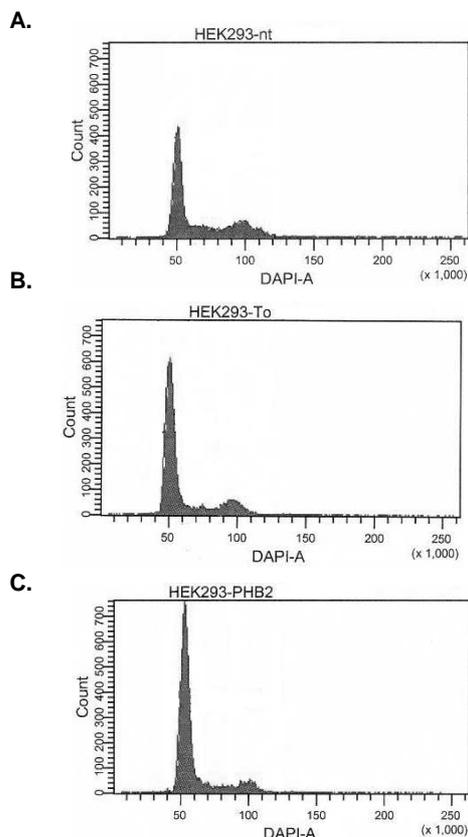
**Figure 54 :** Effet de la surexpression de PHB2 sur la prolifération cellulaire.



Test de clonogénicité. Les cellules HEK293 sont transfectées avec le complexe plasmide/lipofectamine ou non pendant 24h, puis réensemencées à une densité de 1 000 cellules/puit et incubées pendant 7 jours. Les cellules transfectées le sont avec le plasmide non recombinant (vide) ou avec le plasmide recombinant (PHB2). **Gauche.** Photographie des colonies obtenues colorées au cristal violet. **Droite.** Quantification du nombre de colonies observées : représentation en pourcentage du nombre de colonies obtenues avec les cellules non transfectées.

Afin de comprendre comment PHB2 affecte négativement la croissance cellulaire, l'effet de la surexpression de PHB2 sur le cycle cellulaire a été analysé. Les cellules traitées ou non ont été préparées afin de marquer l'ADN ainsi que la protéine PHB2, puis passées dans un cytomètre de flux ce qui a permis de déterminer la distribution des cellules selon les différentes phases du cycle cellulaire (cf. figure 55). Les transfusions de plasmide n'induisent pas la création de nouvelles populations cellulaires (cellules en apoptose ou cellules n'ayant pas subi de cytokinèse) par rapport aux cellules non transfectées. La surexpression de PHB2 (figure 55C) induit une accumulation des cellules en G1 plus conséquente que dans le cas des cellules transfectées avec le plasmide non recombinant (figure 55B), au détriment des phases S et G2.

Figure 55 : Surexpression de PHB2 et cycle cellulaire.



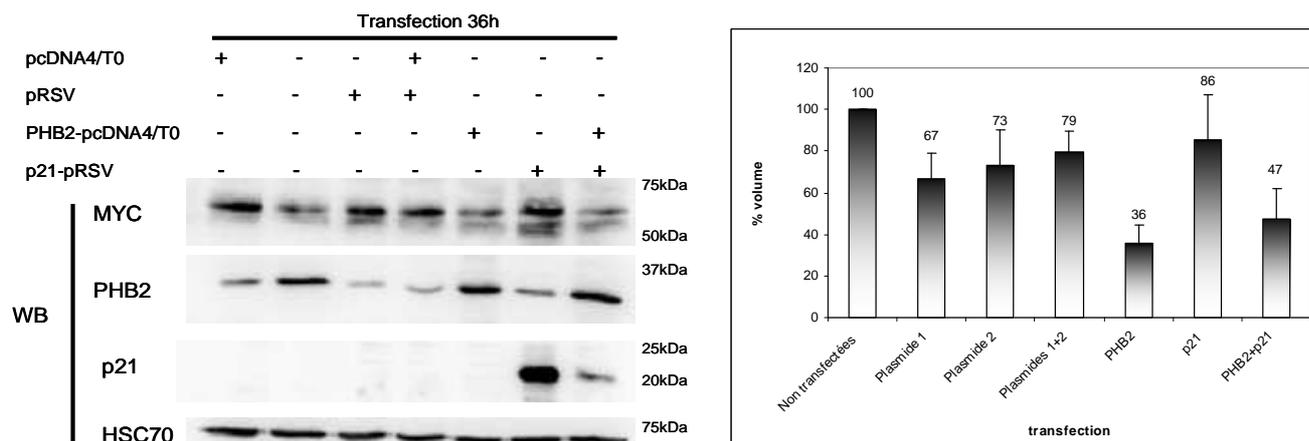
Cytométrie en flux. Les cellules HEK293 sont transfectées avec le complexe plasmide/lipofectamine ou non pendant 24h, marquées et analysées par le cytomètre en flux. DAPI-A correspond à la quantité d'ADN présent dans la cellule. Le premier pic correspond aux cellules en phase G1 (ADN n=2), le second pic correspond aux cellules en phase G2 (ADN n=4) et la phase S se trouve entre les 2 pics. **A.** Cellules non transfectées. **B.** Cellules transfectées avec le plasmide non recombinant (T0). **C.** Cellules transfectées avec le plasmide PHB2 recombinant.

La surexpression de PHB2 n'a donc qu'un très léger effet sur le cycle cellulaire. De plus, l'expression de gènes impliqués dans le cycle comme les cyclines ne varie pas sous surexpression de PHB2 (données non présentées). De ce fait, l'inhibition de la prolifération observée ne peut être imputée à des effets concrets sur le cycle cellulaire.

L'oncogène c-myc est un facteur de transcription capable de réprimer l'expression de *CDKN1A* dans les cellules du sein. Toutefois, dans les cellules colorectales, p21 est un cofacteur transcriptionnel qui régule l'activité de c-myc. C'est pourquoi nous avons analysé l'expression de la protéine c-myc après 36h de surexpression de PHB2, de p21, ou de PHB2 et de p21 (cf. figure 56). Il s'avère que la transfection de PHB2 induit une diminution du taux

de protéine c-myc de près de 60%, effet beaucoup plus faible et apparemment non significatif dans le cas de la transfection de p21 (15%). Dans le cas d'une co-expression de p21 et PHB2, la diminution du taux de c-myc observée est de 50%, montrant un effet limitant de p21 sur l'effet de PHB2. Dans le cas des cellules transfectées avec les plasmides recombinants, une seconde bande apparaît vers 55kDa.

Figure 56 : Effet sur l'expression de l'oncogène c-myc.



**Gauche.** Western blot. pcDNA4/T0 et pRSV : plasmides non recombinant. HSC70 est analysé comme contrôle de charge. **Droite.** Représentation quantitative du taux de protéines c-myc réalisé par le logiciel quantity one. Les intensités des bandes du western sont mesurées et définies en pourcentage de volume par rapport à l'intensité de la bande correspondant au taux de c-myc dans les cellules non transfectées.

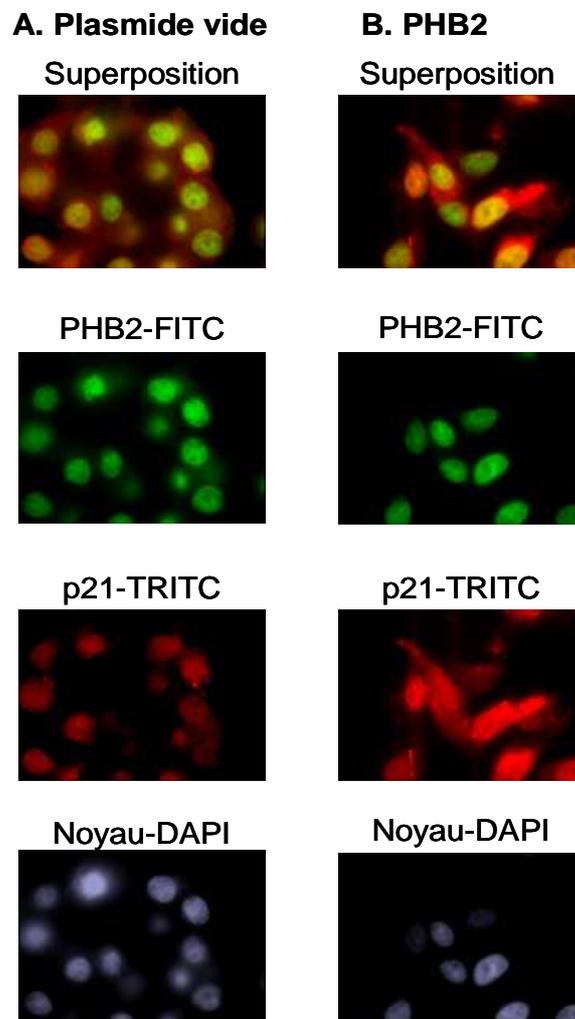
D'après ces résultats, la surexpression de PHB2 seule est corrélée avec une inhibition de l'expression de l'oncogène c-myc. Lorsque p21 et PHB2 sont cotransfectés dans les cellules HEK293, le taux de c-myc est identique aux cas témoins. Au vu des résultats obtenus, PHB2 pourrait réguler négativement l'expression de c-myc mais cette régulation semble annihilée par la surexpression de p21, laissant suggérer que seule la forme de PHB2 non lié à p21 pourrait réguler négativement l'expression de c-myc. L'influence du complexe p21/PHB2 sur l'activité régulatrice de PHB2 sur c-myc n'est pas clairement définie, la formation du complexe pouvant peut-être aboutir à une inhibition de la régulation de c-myc par PHB2.

Par la suite nous avons émis l'hypothèse d'un changement dans l'activité anti-proliférative de p21 induite par sa liaison avec PHB2. Pour confirmer cette hypothèse, la localisation subcellulaire de p21 suite à la surexpression de PHB2 et l'effet de la surexpression de PHB2 et de p21 a été réalisée.

b. PHB2 & p21.

Comme nous l'avons vu précédemment, la localisation subcellulaire de p21 peut influencer ses fonctions sur la prolifération. L'hypothèse d'une relocalisation de p21 suite à la surexpression de PHB2 a donc été vérifiée (cf. figure 57). La surexpression de PHB2 n'induit pas de variation de sa localisation : nucléaire, PHB2 semble uniformément liée à la chromatine. p21 est majoritairement nucléaire. Après transfection de PHB2, p21 est toujours localisé sous forme de granules dans le noyau mais la proportion de protéine cytoplasmique semble plus importante.

Figure 57 : Immunolocalisation.

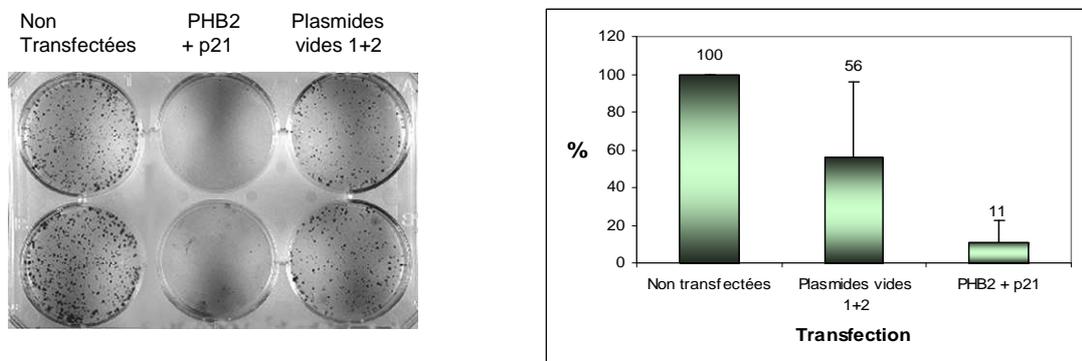


Immunolocalisation. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps de souris anti-p21, un anticorps de lapin anti-PHB2 et avec du Dapi, marqueur des noyaux. Les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes TRITC et FITC sont ajoutés, les cellules sont fixées sur lame de microscope et observées au grossissement 1000. **A.** Transfection du plasmide vide. **B.** Transfection du plasmide recombinant PHB2.

L'analyse de l'expression de *CDKN1A* et de p21 ne montre pas de variation après surexpression de PHB2 (données non présentées) ; l'augmentation du taux de p21 dans le cytoplasme serait donc due à une relocalisation et non à une stimulation de la biosynthèse de la protéine.

Des tests de clonogénicité ont été réalisés sur les cellules HEK293 suite à la surexpression concomitante de p21 et de PHB2. Le traitement des cellules a été réalisé comme précédemment et conformément au protocole (cf. §.IV.1.e). Les résultats sont présentés sur la figure 58. La transfection des cellules HEK293 par les 2 plasmides non recombinants induit un nombre de colonies très variable par rapport aux cellules non transfectées : en moyenne, le nombre de colonies correspond à la moitié de celui des cellules témoins. La transfection elle-même des 2 plasmides a donc un effet négatif sur la prolifération. Toutefois la transfection des cellules par les plasmides PHB2 et p21 recombinants induit un pourcentage de colonies de 11% par rapport aux cellules non transfectées, soit une diminution de 90%. L'effet de la surexpression de PHB2 est donc accentué par celle de p21.

**Figure 58** : Effet de PHB2 et de p21 sur la prolifération cellulaire.

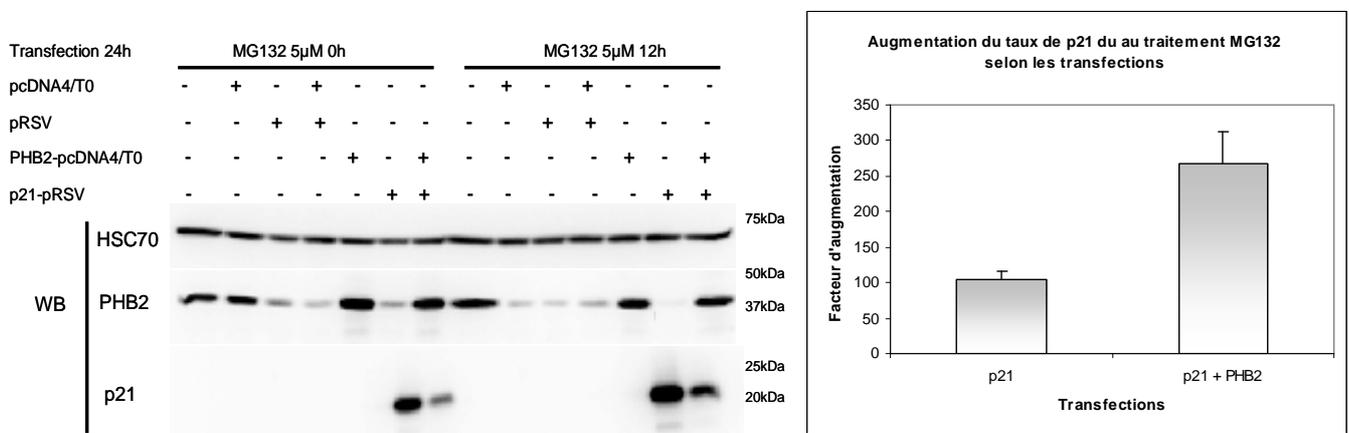


Test de clonogénicité. Les cellules HEK293 sont transfectées avec le complexe plasmide/lipofectamine ou non pendant 24h, puis réensemencées à une densité de 1 000 cellules/puit et incubées pendant 7 jours. Les cellules transfectées le sont avec les plasmides non recombinants (vides) ou avec les plasmides recombinants (PHB2 + p21). **Gauche**. Photographie des colonies obtenues colorées au cristal violet. **Droite**. Quantification du nombre de colonies observées : représentation en pourcentage du nombre de colonies obtenues avec les cellules non transfectées.

La coexpression de PHB2 et de p21 induit donc une forte inhibition de la prolifération, induite aussi bien par p21 que par PHB2. Les 2 protéines agissent en synergie. Cependant, l'implication du complexe p21/PHB2 reste encore à définir.

Lors des expériences où était réalisée la transfection des 2 plasmides recombinants (exemple cf. figure 56), il s'est avéré que le taux de p21 observé est plus faible après co-expression des 2 protéines qu'après surexpression de p21 seule. Par contre, le taux de PHB2 ne varie pas. L'hypothèse d'une implication de PHB2 dans la dégradation de p21 a été alors mise en avant. Les cellules ont été transfectées pendant 36h et traitées avec un inhibiteur du protéasome, le MG132, les 12 dernières heures de la transfection afin de bloquer la dégradation protéique. Les résultats sont présentés sur la figure 59. Lorsque le protéasome est inhibé, le taux de p21 lors de la transfection des 2 plasmides est supérieur à celui observé sans MG132. En effet, l'inhibition du protéasome induit une augmentation du taux de p21 de l'ordre de 100% lors de la transfection du plasmide p21 seul, alors que cette augmentation est de 270% lors de la cotransfection des plasmides p21 et PHB2 (cf. figure 59, droite). Cette différence d'augmentation indique que PHB2 a bien un effet sur la quantité de p21 cellulaire.

**Figure 59** : Inhibition du protéasome et expression de p21.



Inhibition du protéasome et surexpression de PHB2 et de p21. Les cellules sont transfectées avec les plasmides non recombinants ou avec les plasmides recombinants p21 e PHB2 durant 36h. Les cellules sont traitées ou non avec du MG132 5µM pendant les 12 dernières heures de la transfection. **Gauche.** Western blot. HSC70 est utilise comme contrôle de charge. **Droite.** Représentation de l'augmentation du taux de protéines p21.

## 5. Discussion.

L'étude des partenaires d'interaction de p21 par double hybride bactérien à partir d'une banque d'ADNc humaine associée à une étude biochimique a permis de mettre en évidence l'interaction entre p21 et la prohibitine 2 (PHB2).

La protéine PHB2 interagit au niveau de son domaine central PHB (ou SPFH) avec la partie N-terminale de p21, contenant un site de liaison avec les complexes cycline/cdk. Cette interaction entre en compétition avec celle de la cycline B pour p21, confirmant le rôle du domaine d'interaction cycline/cdk de p21 dans la liaison avec PHB2. De plus, cette interaction est directe et se produit *in vivo* dans les cellules cancéreuses colorectales et de fibrosarcome. L'analyse de la localisation subcellulaire des 2 protéines suggère qu'elles interagiraient dans le noyau et plus précisément au niveau de sites spécifiques sur la chromatine. De plus, nous avons montré que la surexpression de PHB2 pourrait être responsable d'une inhibition de la prolifération cellulaire, d'une diminution de l'expression de l'oncogène c-myc et d'une limitation du taux de p21 exprimé après transfection.

Cependant, il n'a pas été possible de mettre en évidence le rôle exact du complexe p21/PHB2 au sein de la cellule tumorale. L'étude de la surexpression de PHB2 et la littérature nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses de travail :

- p21/PHB2 modulerait l'activité de facteurs de transcription.
- PHB2 se lierait à p21 pour induire la dégradation de celui-ci par le protéasome.
- p21/PHB2 jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose et/ou de la différenciation.

La vraisemblance de ces hypothèses est discutée ci-après. Bien qu'apparemment éloignées, ces fonctions présumées peuvent se compléter lors d'une réponse cellulaire à un stimulus spécifique non déterminé.

### **p21/PHB2 pourrait moduler l'activité de facteurs de transcription.**

La localisation de p21 et de PHB2 au niveau de la chromatine suggère que ces 2 protéines interagiraient pour moduler la transcription de gènes cibles, ce qui est en adéquation avec les fonctions de corégulateur transcriptionnel décrites dans la littérature [292,678]. Cette fonction est illustrée avec les hypothèses d'une régulation de l'activité des facteurs de transcription E2F1 et ER $\alpha$ .

Le facteur de transcription E2F1 active la transcription des gènes de la phase S comme la cycline E, mais aussi des gènes codant des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (cyclines, cdk), dans le contrôle de la prolifération (TP53, BRCA1, caspase 3) ainsi que dans la réparation et la réplication de l'ADN (thymidine kinase, PCNA, RAD51, MCM2) [768,769]. p21 module l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription oncogéniques tels qu'E2F1 et STAT3 [560] mais également de facteurs mitogéniques et anti-apoptotiques, notamment sous privation en acides aminés [618]. p21 régule positivement l'expression de protéines d'adhésion et de protéines intracellulaires. A l'inverse, p21 régule négativement l'expression de protéines dont la transcription est stimulée par E2F1 : DHFR et thymidylate synthase (réparation de l'ADN) et cdk1 et mad2 (mitose) [563,618]. Ces travaux suggèrent que p21 interagirait avec E2F1 pour réprimer l'induction de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. En parallèle, il a été démontré que la prohibitine 1 (PHB1), dont PHB2 est très proche, se lie à E2F1 [766] par son domaine C-terminal « coiled coil » [770] pour réprimer son activité transcriptionnelle. Cette interaction implique également Rb ou RNF2 (« RING finger protein 2 »). Le complexe PHB1/RNF2 régule l'activité d'E2F1 par 2 voies de signalisation, l'une directe par la liaison de PHB1 et l'autre passant par la CKI p16 [767]. Parallèlement, Lee *et al.* a montré que PHB2 interagissait avec RNF2 pour réprimer la transcription des gènes par CP2c comme celui de l'alpha-globuline [764].

Dans ce travail, les coimmunoprécipitations réalisées entre p21 et PHB2 laissent à penser qu'un autre partenaire participerait à ce complexe. Or PHB1 et PHB2 peuvent s'assembler pour former des hétérodimères [745,771]. L'existence d'un complexe PHB1/PHB2/p21 serait donc possible et ce complexe pourrait moduler l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription essentiels à la prolifération tumorale comme E2F1. Cependant la surexpression de PHB2 n'induit pas de changement de l'expression des cyclines (données non présentées). Cette hypothèse n'est néanmoins pas à exclure ; le complexe pourrait moduler l'activité d'un autre facteur de transcription ou la transcription de gènes induite par E2F1 qui n'ont pas été testés.

PHB2 se lie à p21 par son domaine PHB et une partie du domaine C-terminal « coiled-coil », précisément au niveau des acides aminés 86 à 218. Ce domaine est également impliqué dans l'interaction de PHB2 avec le récepteur aux œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ), qui interagit au niveau des aa 175 à 198 [671]. Le domaine d'interaction que nous avons défini ici est probablement en réalité plus restreint. PHB2 est également nommé REA parce que les

premiers travaux sur cette protéine l'ont identifiée comme un répresseur des œstrogènes et de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  [678].

Les récepteurs aux œstrogènes sont des facteurs de transcription dépendants de leurs ligands qui régulent la croissance, la différenciation et le maintien de diverses fonctions cellulaires. En présence d'œstradiol et d'ER $\alpha$ , PHB2 est transloqué de la mitochondrie vers le noyau où il inhibe l'expression des gènes dépendants d'ER $\alpha$  [675]. Ces mêmes gènes peuvent être modulés de façon similaire par c-myc. C-myc est fréquemment surexprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses, dont celle du sein et du colon, et est impliqué dans la progression tumorale. Dans les cellules tumorales du sein positives à ER $\alpha$ , la surexpression de c-myc inhibe la transcription de p21, menant à une stimulation de la prolifération tumorale [578]. Parallèlement, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est un gène cible des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  aux œstrogènes dans les cellules tumorales du sein [772] et surtout un régulateur clé de l'angiogenèse, et par conséquent de la prolifération et de la survie tumorale. Dadiani *et al.* conclue que c-myc est régulé positivement par les œstrogènes et qu'il existe une coopération entre ER $\alpha$  et c-myc dans la régulation du VEGF par les œstrogènes. C-myc simulerait la régulation œstrogénique de l'angiogenèse [773]. De plus, le récepteur ER $\alpha$  peut induire la transcription de *c-myc* en réponse aux œstrogènes mais surtout s'il n'interagit pas avec TIP30, corégulateur transcriptionnel ayant une activité de suppresseur de tumeur [774].

Dans cette étude nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de l'oncogène c-myc suite à la surexpression de PHB2. Plus précisément, cette diminution n'est pas due à une régulation transcriptionnelle (données non présentées) et se traduit par l'apparition d'une forme plus courte d'environ 50 kDa. Persson *et al.* a mis en évidence 2 protéines précipitées avec des anticorps dirigés contre c-myc : l'une présente une masse moléculaire de 65 kDa, est nucléaire et se lie à l'ADN, et l'autre de masse moléculaire de 49 kDa est exclusivement cytosolique. Les auteurs déduisent que cette seconde forme serait une protéine associée à c-myc [775]. A notre connaissance, aucune étude ultérieure n'a confirmé cette hypothèse ; l'existence d'un lien entre ces travaux et l'apparition d'une protéine de 50kDa après surexpression de PHB2 pourrait être envisagée. Quoiqu'il en soit, la surexpression de PHB2 induit une diminution de la forme nucléaire de c-myc (65kDa) : il est envisageable que PHB2 interagirait avec ER $\alpha$  pour inhiber la transcription de c-myc et stopper la prolifération cellulaire. La participation de p21 à cette inhibition devrait être envisagée : p21 coopère avec CBP pour réguler spécifiquement la transcription des gènes cibles d'ER $\alpha$  en réponse aux œstrogènes [560]. Il est possible que l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  sur le gène c-myc soit modulée négativement par le complexe p21/PHB2 afin

d'inhiber la prolifération cellulaire. Dans ce cas, le domaine de liaison de PHB2 sur p21 exclurait les acides aminés impliqués dans l'interaction avec ER $\alpha$ .

### **PHB2 se lierait à p21 pouvant mener à la dégradation de celui-ci par le protéasome.**

Lors de la surexpression concomitante des 2 protéines, le taux de p21 est inférieur à celui observé après surexpression de p21 seule. Cet effet n'a pas été observé dans le cas de PHB2, indiquant que la diminution du taux de p21 n'est pas due à l'efficacité de la transfection. L'étude de l'expression génique de p21 suite à la surexpression de PHB2 ne montre pas d'influence de PHB2 sur la production de p21. Nous avons donc voulu vérifier si la surexpression de PHB2 avait une incidence sur l'expression de p21 en bloquant l'activité du protéasome. Il s'avère que l'augmentation du taux de p21 suite à l'inhibition du protéasome est supérieure lorsque PHB2 et p21 sont surexprimés par rapport à l'augmentation obtenue après surexpression de p21 uniquement. Il y aurait donc un lien entre la surexpression de PHB2 et la dégradation de p21 par le protéasome.

La dégradation de p21 par le protéasome est un mécanisme dépendant et indépendant des complexes ubiquitines. Les conditions intracellulaires et stimuli environnementaux nécessaires à l'induction de la dégradation de p21 stimulent diverses voies de signalisation. En conditions physiologiques, la dégradation de p21 par ubiquitination est dépendante de p53 et de 3 complexes ubiquitines ligases impliqués dans des conditions très définies. Hormis ces conditions, la dégradation de p21 est indépendante des ubiquitines ; p21 interagit alors avec la sous-unité C8 $\alpha$  de la sous-unité 20S du protéasome [581]. La liaison de p21 avec une cdk favorise la dégradation de p21 [776], alors que la cycline D1 entre en compétition avec C8 $\alpha$  et interfère avec la dégradation de p21 [777]. En particulier, le complexe cycline E/cdk2 phosphoryle p21 sur S130 ce qui induit son ubiquitination [584]. p21 lié aux complexes cycline A/cdk2 ou cycline E/cdk2 interagit avec Skp2, menant à sa dégradation [581]. La dégradation de p21 au cours du cycle cellulaire implique des protéines spécifiques de chaque phase, dont Skp2 qui permet le passage de la phase G1 à la phase S. Deux variants d'épissage de Skp2 existent, A et B, qui ont des substrats différents. Par exemple, seul A interagit avec p27. Skp2 interagit avec p27 et p21 mais dans le cas de p21, la littérature ne mentionne pas quel variant est impliqué. PHB2 interagit avec Skp2B, qui est fréquemment surexprimé dans les cancers, ce qui l'inhibe et donc participe à la modulation de l'activité des œstrogènes et donc à la tumorigenèse [758]. L'existence d'un lien entre le complexe p21/PHB2, Skp2 et le système du protéasome pourrait éventuellement être envisagée.

La dégradation de p21 est également un mécanisme de réponse en conditions pathologiques. De faibles doses de ROS ou d'irradiation par UV induisent la dégradation de p21 *via* une voie dépendante des ubiquitines, de l'export nucléaire de la protéine et de Skp2 [556,778]. La stimulation par les UV induit l'activation de la sérine/thréonine kinase GSK3 $\beta$ , inhibée par Akt, qui phosphoryle p21 sur la sérine 114, menant à une dégradation indépendante des ubiquitines. Lors du catabolisme basal de p21, GSK3 $\beta$  phosphoryle également p21, mais sur la thréonine 57 [779]. Au contraire, la demi-vie de p21 est augmentée par inhibition de GSK3 $\beta$  par Akt sous stimulation par le sérum [780].

D'après ces données, la formation du complexe p21/PHB2 pourrait être impliquée dans la dégradation de p21 par le protéasome. Si cette hypothèse est avérée, un nouveau rôle de PHB2 et un nouveau système de régulation de p21 seraient mis en évidence. Les études ultérieures nous permettront de confirmer cette hypothèse et de définir les mécanismes menant à la dégradation de p21 suite à la surexpression de PHB2, et notamment si les ubiquitines et Skp2 sont impliquées. Par la suite, les conséquences sur les fonctions de p21 devraient être examinées. En effet, l'interaction entre p21 et PHB2 pourrait peut-être induire une dissociation de ces protéines du facteur de transcription qu'elles moduleraient.

### **p21/PHB2 jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose et/ou de la différenciation.**

p21 étant un puissant inhibiteur du cycle cellulaire, et PHB2 se fixant au niveau d'un domaine de liaison aux cycline/cdk, nous avons émis l'hypothèse que la liaison de PHB2 avec p21 jouait un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. Les cellules HEK293 ont été transfectées afin de surexprimer transitoirement PHB2 et/ou p21 pour analyser l'activité des protéines sur la prolifération cellulaire. Il s'avère que la surexpression de PHB2 pendant moins de 48h est très probablement suffisante pour induire un net recul de la croissance cellulaire potentialisée par la surexpression concomitante de p21. A l'instar de PHB1 [781], PHB2 pourrait être un suppresseur de tumeur dans les cellules cancéreuses colorectales. L'étude que nous avons réalisée dans les cellules HEK293 montre que les 2 protéines auraient une activité antiproliférative, mais l'implication du complexe p21/PHB2 dans ce phénomène n'est pas confirmée. De plus, bien que nous ayons montré que PHB2 stopperait la prolifération cellulaire, le processus menant à l'arrêt de la prolifération qui est en jeu (apoptose, sénescence, différenciation...) n'a pas été défini. Les fonctions de p21 ne se limitent pas à l'inhibition du cycle cellulaire : p21 est un régulateur clé capable de « diriger » la cellule vers d'autres processus [110,518], notamment vers l'apoptose [110,568] et la

différentiation [633]. De ce fait, l'hypothèse d'un arrêt de la prolifération par le complexe p21/PHB2 menant à l'apoptose ou à la différenciation devrait être envisagée. L'implication du complexe semble possible lors de l'apoptose comme lors de la différenciation cellulaire.

Les fonctions de p21 dans l'apoptose sont encore ambiguës, bien que son implication soit avérée [110]. La capsaïcine, inducteur de l'apoptose [782-786], potentialise la voie de signalisation de p53, induisant l'expression de p21 et Bax [787,788]. Parallèlement, la capsaïcine interagit avec PHB2 et la relocalise de la mitochondrie vers le noyau aboutissant à une apoptose [676]. Cet effet est également observé dans les cellules HeLa déficientes en PHB2 où apparaît une apoptose dépendante des caspases *via* la régulation négative de Hax-1 et la fragmentation mitochondriale [675]. Il pourrait donc y avoir un lien entre la relocalisation de PHB2 hors de la mitochondrie, son interaction avec p21 et l'induction de l'apoptose dépendante des caspases, particulièrement sous traitement par la capsaïcine. De plus, l'inhibition de l'expression de c-myc observée pourrait participer à l'induction de la mort cellulaire.

D'après l'analyse de la littérature, p21/PHB2 pourrait agir sur le processus de différenciation, notamment par le biais d'Akt. Sun *et al.* a mis en évidence la liaison de PHB2 et d'Akt [743] ; le domaine d'interaction de PHB2 (aa 120-232) est également compris dans le domaine d'interaction avec p21 défini dans nos travaux. Akt est une famille de protéines kinase qui régulent la survie et le métabolisme cellulaire notamment par régulation de la progression du cycle cellulaire. Deux isoformes d'Akt existent, Akt1 et Akt2. Seule Akt1 est essentielle à la prolifération cellulaire, tandis qu'Akt2 favorise la sortie du cycle cellulaire et est impliquée dans la différenciation des cellules musculaires squelettiques [521]. Dans les myoblastes différenciés, l'absence d'Akt2 empêche les myoblastes de sortir du cycle cellulaire, et à l'inverse la surexpression d'Akt2 stoppe le cycle cellulaire à la transition entre les phases M et G1 et induit une augmentation du taux de p21 nucléaire. Akt2, et non Akt1, est capable d'interagir avec PHB2 et p21. PHB2, et non PHB1, se lie à la partie C-terminale d'Akt2 au niveau des aa 413 à 480 et inhibe la différenciation musculaire *via* l'inhibition d'Akt2. En effet, Akt2 est nécessaire à l'activité du facteur de transcription MyoD, et donc à la transcription de la *myogénine* [521,743]. De même, Akt2, et non Akt1, interagit spécifiquement avec p21 pour stopper la progression du cycle cellulaire [521]. En fait, Akt est hyperactivé dans de nombreuses tumeurs et régule la survie et/ou la prolifération tumorale en partie par phosphorylation de p21, induisant la stabilisation de la protéine [587]. Akt

constitutivement activé stimule l'expression de p21 et la différenciation myogénique ; c'est un intermédiaire et p21 un effecteur critique de la voie de survie des myoblastes ; ils sont actifs durant les phases précoces de la différenciation [789].

Nous pouvons donc envisager l'hypothèse d'une implication du complexe p21/PHB2 dans la différenciation cellulaire. En effet, p21 interagit avec Akt2, menant à l'arrêt de la prolifération, et régule spécifiquement la transcription des gènes cibles d'ER $\alpha$  en réponse aux œstrogènes, induisant des phénomènes spécifiques de la différenciation des cellules mammaires [560]. p21 peut donc être défini comme un coactivateur transcriptionnel de la différenciation cellulaire, fonction pouvant également être attribuée à PHB2. Les protéines p21, PHB2 et Akt2 pourraient éventuellement s'assembler pour stopper le cycle cellulaire et éviter que la cellule entre dans un processus de différenciation.

Cependant, l'implication de l'inhibition de l'expression de c-myc dans ce processus semble peu évidente. Certes c-myc serait impliqué dans le contrôle de la taille de la cellule et dans la différenciation musculaire, mais contrairement aux myoblastes normaux, les myoblastes exprimant c-myc sont incapables de former des myotubes et montrent une expression réduite des facteurs de différenciation MyoD, myogénine et Myf5 [790,791]. C-myc serait alors un inhibiteur de la différenciation cellulaire, ce qui semble en contradiction avec l'hypothèse d'une inhibition de la différenciation par PHB2.

## VI. Conclusion.

Ce travail a permis de mettre en évidence l'interaction entre p21 et PHB2, très probablement nucléaire, et d'émettre de nombreuses hypothèses quant au rôle du complexe p21/PHB2. Nous proposons le modèle suivant : l'interaction entre p21 et PHB2 induit la modulation de l'activité de facteurs de transcription, soit par fixation du complexe à ces derniers, soit par dégradation de p21 ; ce complexe participerait à l'inhibition de la prolifération cellulaire et à la régulation de l'apoptose et/ou de la différenciation.

Les études ultérieures devraient être axées dans un premier temps sur l'hypothèse d'une modulation de facteurs de transcription comme le récepteur aux œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) par le complexe p21/PHB2. Pour ce faire, l'utilisation d'un modèle tumoral issu de tissu mammaire serait plus adéquate. Dans un second temps, la présence d'un troisième partenaire serait à vérifier et ce dernier devrait être identifié. Parallèlement, le processus inhérent à l'inhibition de la prolifération cellulaire du à PHB2, apoptose, différenciation ou autre, devrait être élucidé. Chez le tabac, Ahn *et al.* a montré que la surexpression des prohibitines augmentait la production de ROS de 10 à 20 fois et induisait une sénescence précoce des feuilles [792]. Il serait intéressant de tester l'implication du complexe p21/PHB2 dans une réponse aux stress oxydatifs, et notamment de voir si un lien avec les localisations mitochondriales des 2 protéines existerait.

p21 et PHB2 sont impliquées dans de nombreux processus communs : contrôle de la croissance cellulaire, apoptose, différenciation, sénescence et interaction entre l'hôte et les virus. Il semble probable que le complexe p21/PHB2 soit induit par différents stimuli environnementaux et possède plusieurs activités. Par le jeu des interactions protéine-protéine et les variations de sa localisation subcellulaire, le complexe p21/PHB2 pourrait être un pivot de la réponse cellulaire aux stress biotiques et abiotiques.

## **DISCUSSION GENERALE.**

La collaboration entre deux équipes de recherche de l'Université d'Angers, dont les thématiques de recherche portent pour l'une sur la germination de *Medicago truncatula* et pour l'autre sur les mécanismes moléculaires de la prolifération tumorale, a abouti à la mise en place d'une nouvelle technique au sein du laboratoire permettant d'améliorer les connaissances fonctionnelles de protéines d'intérêt. Le travail présenté ici, issu de cette collaboration, est axé sur l'utilisation du double hybride bactérien dans l'étude des interactions protéine-protéine.

Initialement, l'objectif de ce travail était de croiser des informations sur les fonctions de 2 protéines impliquées dans la tumorigenèse, p21 et STAT3, et d'une nouvelle protéine mise en évidence dans la régulation de la germination de la légumineuse *Medicago truncatula*, nommée MtSAP1. Pour ce faire, nous avons étudié les interactions protéine-protéine de chacune de ces protéines d'intérêt par double hybride bactérien. La mise en place du double hybride en système bactérien au sein du laboratoire d'accueil Physiologie Moléculaire des Semences a permis de découvrir de nouvelles interactions impliquant p21, STAT3 et MtSAP1 dans différents processus cellulaires.

Le double hybride bactérien est une technique rapide d'analyse simultanée des interactions protéiniques mise au point chez la levure par Fields et Song et adaptée chez la bactérie par Joung et al. [53,54]. La protéine d'intérêt recombinante est exprimée conjointement avec une protéine cible recombinante ; l'interaction entre ces 2 protéines active la transcription du gène rapporteur ce qui permet la croissance de la bactérie sur un milieu spécifique. La séquence codant la protéine cible est isolée et identifiée par bioinformatique. Le terme cible peut désigner l'ensemble des protéines d'une cellule : dans ce cas la production recombinante des protéines cibles est issue de la construction d'une banque d'ADNc dans une condition donnée ; c'est ce cas que nous avons choisi d'étudier. Cette technique présente de nombreux avantages : la bactérie est un organisme simple à cultiver, facilement manipulable, peu onéreux et dont la croissance est rapide. Le double hybride en bactérie est notamment un système d'étude plus rapide que le phage display et plus efficace que le double hybride de la levure. De plus, le clonage des séquences codant les protéines recombinantes dans les plasmides d'expression procaryotiques est simple à réaliser et la sélection des clones positifs est rapide. Chez la levure, beaucoup de protéines appât recombinantes sont capables d'activer la transcription du gène rapporteur en l'absence d'une interaction avec une protéine cible, ou d'induire une toxicité pour la levure, risque très faible chez la bactérie. L'activation du gène rapporteur non spécifique peut également survenir après interaction entre une des protéines recombinantes et une protéine endogène de l'hôte. Contrairement à la levure, la bactérie ne

possède que très peu d'orthologues aux protéines des organismes d'étude que sont l'Homme et *Medicago truncatula* : ainsi le nombre de faux positifs est bien inférieur dans le double hybride bactérien et le panel de protéine appât utilisables est de ce fait bien supérieur.

Toutefois, il présente 2 inconvénients majeurs : la production des protéines n'est pas toujours conforme à celle observée dans l'organisme initial et la localisation subcellulaire des protéines n'est pas forcément respectée, ce qui peut modifier les interactions entre protéines. Après synthèse par les ribosomes, la protéine est dirigée vers les organites cellulaires afin d'être correctement conformée. Outre la mise en place des structures secondaires et tertiaires, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles comme les glycosylations ou l'ajout de chaînes lipidiques, aboutissant à la production d'une protéine fonctionnelle. Or les glycosylations sont fonction de chaque protéine, ne sont pas du même type chez la levure et chez les eucaryotes supérieurs et sont même inexistantes chez la bactérie. La synthèse en système bactérien peut mener à une protéine mal conformée et/ou non fonctionnelle. En outre, la localisation subcellulaire joue un rôle important dans la mise en place des interactions et la bactérie est un organisme procaryote : l'adressage modifié des protéines recombinantes peut induire des interactions chimériques.

Les interactions protéine-protéine sont très fréquemment régulées par les états d'activation des protéines impliquées, en majorité déterminés par l'état de phosphorylation de résidus spécifiques de la protéine, comme c'est le cas pour STAT3, qui est activé par phosphorylation sur la tyrosine 705 et la sérine 727. L'activation des protéines se fait en réponse à des stimuli intracellulaires ou extracellulaires et ne peut être reproduite par la bactérie. En conséquence, les protéines recombinantes produites peuvent ne pas être dans un état d'activation propice, ce qui limite le nombre de partenaires d'interaction identifiables. Néanmoins, des interactions peuvent persister en l'absence d'activation des protéines, notamment lors d'études en système hétérologue ou *in vitro*. Dans le cas de STAT3, la phosphorylation sur la tyrosine 705 induit une dimérisation de la protéine, mais n'est pas responsable de l'interaction entre les domaines, elle en est uniquement le déclencheur. Les interactions se font entre motifs ou entre domaines spécifiques ; beaucoup de protéines appartiennent à des familles structurellement proches et possèdent des domaines homologues ou consensus, même si leurs fonctions sont éloignées. La présence seule d'un motif spécifique peut induire une interaction, sans pour autant qu'elle se réalise dans l'organisme initial. Les modifications conformationnelles des protéines ainsi que la présence de domaines consensus peuvent créer des interactions chimériques faussant ainsi les résultats du double hybride.

Le double hybride en bactérie n'est donc pas une méthode permettant d'obtenir une liste fiable et exhaustive de tous les partenaires d'interaction d'une protéine. Néanmoins, elle permet d'obtenir une liste conséquente de candidats potentiels à l'interaction avec la protéine d'intérêt. Comme pour toute technique *in vitro*, les interactions mises en évidence dans ce système doivent être vérifiées par des expériences *in vivo*. L'étude de la littérature traitant des protéines d'intérêt et cibles permet d'affiner la liste des candidats. Par contre, le double hybride met uniquement en évidence des interactions directes, ce qui n'est pas le cas des coimmunoprécipitations par exemple. Le double hybride est donc un bon outil d'analyse des interactions protéine-protéine, essentiellement comme approche sans a priori. Il est régulièrement utilisé dans la littérature pour mettre en évidence de nouvelles interactions afin de connaître ou d'approfondir les connaissances sur les fonctions de la protéine d'intérêt. Néanmoins, le double hybride est souvent utilisé comme point de départ : après mise en évidence de l'interaction, les auteurs confirment l'existence du complexe *in vivo* puis étudient les fonctions ou les conséquences cellulaires de la formation du complexe.

Dans ce travail nous avons réalisé 3 doubles hybrides bactériens pour 3 protéines appât, p21, STAT3-Cter (domaine de transactivation de la protéine STAT3) et MtSAP1, à partir de 2 banques d'ADNc, l'une d'origine humaine et l'autre issue de la légumineuse *Medicago truncatula*.

Le gène *MtSAP1* a été mis en évidence lors de l'analyse d'une banque soustractive et suppressive avant et après la germination de *Medicago truncatula* [108] : il est exprimé durant la maturation, son taux est maximal dans la graine sèche et cette expression s'éteint durant les premiers stades de la germination. Nous avons donc supposé que MtSAP1 est une protéine régulée négativement lors de la germination. L'étude fonctionnelle du gène que nous avons réalisé dans un premier temps montre une sensibilité de *MtSAP1* à divers stress abiotiques, notamment lors d'un traitement avec une hormone anti-germinative, l'acide abscissique, ou lors d'un stress hypoxique. Sous ces conditions, l'expression de la protéine est induite, suggérant l'implication de MtSAP1 dans ces processus. De plus, l'analyse bioinformatique de MtSAP1 montre qu'elle appartient à la famille des protéines associées au stress SAP. Cependant son rôle reste indéterminé, c'est pourquoi nous avons réalisé une étude de ses interactions par double hybride.

Les protéines p21 et STAT3 ont été largement étudiées, tant au niveau structurel que fonctionnel. Elles sont fortement impliquées dans les processus tumoraux chez l'Homme : p21 agit comme un suppresseur de tumeur, au contraire de STAT3, facteur de transcription à activité oncogénique. Le domaine C-terminal de STAT3 est phosphorylé pour induire l'activité transcriptionnelle oncogénique de STAT3. Lorsqu'il est constitutivement activé, STAT3 permet l'échappement de la cellule à tous les processus pouvant réguler la prolifération et permet l'altération de l'environnement extracellulaire afin de favoriser l'invasion métastatique. La protéine p21 est un inhibiteur de la progression tumorale par blocage du cycle cellulaire et de la synthèse d'ADN. Mais p21 est également impliqué dans les autres réponses cellulaires. Ces 2 protéines présentent un fort intérêt dans la mise en place de stratégies thérapeutiques : p21 est un pivot de la réponse antiproliférative car elle agit sur la prolifération mais également sur la différenciation, le vieillissement et la mort cellulaire [110], alors que STAT3 favorise la prolifération et l'invasion tumorale en stimulant la synthèse de protéines effectrices [111]. Chez les plantes, ces protéines possèdent des orthologues assez éloignés au niveau de leur séquence primaire, bien que les fonctions essentielles soient apparemment conservées. Nous avons choisi d'étudier les interactions de ces protéines par double hybride afin d'approfondir les connaissances sur leurs fonctions.

L'expression du gène *MtSAP1* étant maximale dans la graine sèche, nous avons choisi de construire une banque d'ADNc issue des transcrits de la graine sèche de *Medicago truncatula* pour réaliser ce double hybride. La banque d'ADNc humaine que nous avons utilisé est issue des transcrits d'une lignée cellulaire tumorale colorectale humaine, la lignée LS180. Ces cellules ont été traitées avec un inhibiteur de la topoisomérase I, le SN38, métabolite de l'irinotécan qui est utilisé dans les thérapies anticancéreuses. Le traitement avec du SN38 a permis d'augmenter considérablement le taux de p21 exprimé dans la cellule sans modifier le taux ou l'activation de STAT3. Quelque soit la banque, nous avons choisi ces conditions (graine sèche et lignée colorectale traitée) afin d'obtenir la probabilité d'avoir un maximum de partenaires d'interaction la plus élevée possible. Le réseau des interactions protéine-protéine est dynamique et représentatif d'un instant donné. Contrairement au génome qui est stable, le protéome est en évolution constante, et de fait les interactions se modifient en fonction des stimuli, de la présence des protéines, de leur état d'activation, de leur localisation...L'étude des interactions protéine-protéine ne peut donc aboutir à la constitution d'une carte de toutes les interactions protéiques existantes. De plus, de meilleurs résultats sont obtenus lorsque le crible est plus spécifique. Les cribles sur des voies spécifiques ou sur des facteurs de maladies donnent des résultats plus exhaustifs, couvrant toutes les facettes du

système étudié, contrairement aux cribles globaux. Pour être représentative des transcrits produits dans les cellules, la banque doit contenir au minimum 1 million de clones et la longueur des séquences clonées dans le plasmide cible doit être suffisamment importante. L'utilisation de trop petits fragments augmente la probabilité de faux-positifs. En effet, un fragment d'ADNc codant uniquement un domaine ou une partie de protéine peut induire une interaction aspécifique, due à la présence de séquences consensus par exemple. D'autre part, la séquence peut être insuffisante pour identifier le partenaire d'interaction lors de la comparaison des séquences cibles avec les bases de données. Les banques d'ADNc humaine et de *Medicago truncatula* comportent respectivement 9 millions et 5 millions de clones, et nous avons retenu les fragments d'ADNc dont la taille est au minimum de 400pb. Les fragments les plus longs présentent entre 2 000 et 3 000 pb : les protéines codées par ces ADNc ont donc une masse moléculaire comprise entre 15 et 112kDa, ce qui correspond à la majorité des protéines exprimées dans une cellule. D'après les critères de qualité du double hybride, les banques sont donc très représentatives des protéines exprimées dans les cellules des organismes choisis.

Après analyse des résultats, nous avons comparé certains paramètres et observés plusieurs similitudes. Dans tous les cas, le pourcentage de faux positifs obtenus est de l'ordre de 30%, la majorité des séquences obtenues soit sont d'origine génomique soit codent des protéines ribosomales et enfin parmi les partenaires, une forte propension est localisée dans le cytoplasme. La proportion de faux-positifs obtenues correspond à celle obtenue dans ce type d'étude. Le nombre de séquences génomiques obtenues est surprenant : ceci pourrait être du à une contamination de séquences génomiques lors de la purification des ARNm qui, clonées dans le plasmide pTRG en aval de la séquence de l' $\alpha$ RNApol, peuvent être traduit en protéine chimérique. Au contraire, la présence de nombreuses séquences codant des protéines ribosomales est cohérente : lors de leur synthèse, les protéines interagissent avec certaines protéines ribosomales. Bien que quelques protéines ribosomales soient impliquées dans d'autres processus, et notamment dans le cancer [502], nous avons choisi d'ignorer pour le moment ces partenaires potentiels ; les protéines ribosomales retrouvées sont identiques dans les 3 double-hybride, ce qui renforce l'idée d'une interaction aspécifique des protéines appât avec ces cibles. Enfin, la présence de nombreuses protéines cytoplasmiques s'explique par la plus forte proportion de protéines localisées dans le cytoplasme par rapport aux protéines nucléaires. De plus, chaque protéine d'intérêt peut être localisée dans le cytoplasme. Bien que le nombre de clones positifs obtenus soit très différent entre les 3 doubles hybrides (environ 200 pour STAT3-Cter, 100 pour p21 et 50 pour MtSAP1), les proportions de faux positifs, de

séquences génomiques et de protéines ribosomales sont identiques. Certaines protéines sont représentées plusieurs fois dans un même crible (exemple de BET1L dans le crible de STAT3-Cter, dont la même séquence est retrouvée 15 fois), suggérant une redondance de nombreuses séquences.

Parmi les partenaires d'interaction potentiels, nous avons remarqué la présence de partenaires connus. Le crible de MtSAP1 met en évidence l'homodimérisation de MtSAP1, puisque l'une des cibles est la protéine appât elle-même. Or, les protéines SAP sont capables de former des homodimères [242]. Dans le cas de p21, dont beaucoup de partenaires sont déjà connus, nous avons retrouvé la séquence codante de cdk4. p21 interagit avec les complexes cycline/cdk, et notamment avec le complexe cycline D/cdk4 présent au cours de la phase G1 du cycle cellulaire [530]. p21 est surexprimé lors du traitement avec du SN38, qui induit un blocage des cellules à la transition entre la phase G1 et la phase S, et inhibe la progression du cycle cellulaire *via* son interaction avec les complexes cycline/cdk. Le fait de retrouver des partenaires connus parmi les résultats du crible permet de valider la méthode appliquée à ces protéines appâts. Dans le cas de STAT3-Cter, aucun des partenaires potentiels n'est décrit dans la littérature comme étant en complexe avec STAT3. Toutefois, le manque de partenaires connus parmi les résultats ne conteste pas la validité de la méthode appliquée à STAT3. D'une part nous n'avons utilisé que la partie C-terminale de STAT3 pour le crible, éliminant toutes les interactions impliquant d'autres domaines. D'autre part dans les 3 doubles hybrides, la banque n'a pas été totalement criblée, compte tenu de l'importance de la taille des banques et du temps imparti pour réaliser ce travail.

Certains partenaires potentiels ont été mis en évidence dans les 3 doubles hybrides : GAPDH, EF1A1 et PPIA ainsi qu'une protéine de la famille des glutathion-S-transférases (GST25 ou GSTP1). Ces protéines présentent des fonctions différentes et interagiraient avec les protéines appât, dont les fonctions divergent aussi. Il est donc possible que ces interactions soient dues à des séquences consensus ou à des structures tridimensionnelles particulières ; dans ce cas, ces protéines pourraient être retrouvées parmi les partenaires potentiels de nombreux double hybride. L'hypothèse d'une activation des gènes rapporteurs uniquement due à l'expression de ces protéines pourrait être envisagée. Les protéines GAPDH, EF1A1, GSTP et PPIA possèdent des orthologues très similaires chez *E. coli*, respectivement nommés GAPDH, sous-unité 1 de la sulfate adénylyltransférase, GST et rotamase A. Toutes sont impliquées dans le métabolisme de la bactérie et ne montreraient pas d'activité transcriptionnelle ; cependant il n'est pas impossible qu'il y ait un effet de ces protéines sur la transcription des gènes rapporteurs du à la surexpression des protéines plus qu'aux protéines

elles-mêmes. Nous avons choisi de mettre de côté ces partenaires potentiels, dont les orthologues existent chez la bactérie, parce qu'elles semblent présenter un intérêt moindre au niveau fonctionnel.

Le crible d'une banque d'ADNc par double hybride bactérien permet de mettre en évidence simultanément de nombreuses interactions avec la protéine d'intérêt. Ces interactions en système procaryote doivent être vérifiées dans l'organisme initial, *in vivo*. Toutefois ce type d'étude permet d'envisager rapidement de nombreuses hypothèses quant aux fonctions possibles des protéines.

L'une des applications les plus importantes du crible par double hybride est la mise en exergue de fonctions inconnues par détermination d'interactions protéine-protéine potentielles. Dans le cas de MtSAP1, les fonctions sont supposées : elle serait impliquée dans la réponse à l'ABA, à la sécheresse, à l'hypoxie et au froid. La présence de protéines impliquées dans ces phénomènes parmi les partenaires d'interaction potentiels (par exemple HSP20 et LEA5) renforce ces premières données. Nous avons choisi 3 candidats, MBF1, DREB et HR, comme candidats à l'analyse des fonctions supposées de MtSAP1. Les 3 protéines sont présentes chez *Medicago truncatula* mais elles n'ont pas été étudiées. La recherche des orthologues à la fois chez les plantes et chez l'Homme a cependant permis de relier leurs rôles durant les stress abiotiques et de supposer un lien avec MtSAP1. MBF1 participe à la réponse aux stress oxydatifs, thermiques et à l'ABA [240,243], DREB à la réponse aux stress thermiques et hydriques [220], et HR à la réponse aux stress oxydatifs [232]. MtSAP1 appartient à la famille des protéines SAP, cofacteurs transcriptionnels nucléaires. La mise en évidence des interactions entre MtSAP1 et DREB ou HR, 2 facteurs de transcription, renforce l'hypothèse d'une activité transcriptionnelle. Parallèlement, MtSAP1 serait également cytoplasmique et son interaction avec MBF1 pourrait définir un rôle pivot de MtSAP1 dans la signalisation intracellulaire en réponse aux stress.

Les banques d'ADNc ont été réalisées à partir de tissus ou de lignées dans lesquels l'expression de la protéine d'intérêt est maximale. De ce fait, il est probable qu'un maximum de partenaires d'interaction soit présent. Cependant, les interactions potentielles détectées

n'ont pas toujours lieu dans ce tissu ou dans cette condition précise, bien que ce soit le cas pour la majorité. Ceci représente à la fois un avantage et un inconvénient du double hybride : les interactions mises en évidence ne permettent pas de construire une carte des interactions ayant lieu à un temps donné mais permettent de supposer l'existence d'interactions et donc de nouvelles fonctions ou de nouvelles régulations impliquant la protéine d'intérêt. Bien que les fonctions de STAT3 et p21 aient été très largement étudiées, il reste quelques interrogations concernant certains aspects de leur fonctionnement. Cette étude a permis d'envisager de nouveaux aspects de p21 et de la partie C-terminale de STAT3.

Le double hybride de p21 a permis de mettre en évidence de nouvelles interactions protéine-protéine agissant dans les processus tumoraux (le choix des candidats a été discuté précédemment) mais il a également permis d'ouvrir de nouvelles perspectives sur les rôles de p21 dans d'autres processus : infection virale, sénescence et différenciation. Ainsi, p21 interagirait avec CD81, PPIA et SUPT4H. La synthèse de p21 est inhibée par le virus de l'hépatite C au niveau post-transcriptionnel [650], et p21 interagirait avec CD81, récepteur membranaire pour ce même virus [700]. PPIA et SUPT4H sont nécessaires à la réplication du virus HIV-1. D'après les études sur p21 dans les cellules infectées par le HIV-1, les interactions entre PPIA et p21, et entre SUPT4H et p21 pourraient éventuellement permettre au virus de détourner la machinerie du cycle cellulaire à son avantage [703,705]. Nous avons retrouvé une région génomique particulière parmi les résultats : WBSCR1. Cette région est celle où s'intègre le virus de l'hépatite B, menant à une carcinogenèse hépatique. L'existence d'une interaction entre cette région et p21 est surprenante ; il pourrait être intéressant d'étudier cette interaction *in vivo*, en particulier de montrer si cette interaction est de type protéine-ADN ou protéine-protéine et si elle est impliquée dans le cancer hépatique induit par l'hépatite B.

Cette étude pourrait également aider à la compréhension du rôle de p21 dans la sénescence et la différenciation. p21 serait un initiateur de ces phénomènes mais ne participerait pas au maintien du phénotype cellulaire associé [110]. La péroxiredoxine 2 est un suppresseur de tumeur qui inhibe l'entrée en sénescence par inhibition de la voie ERK [442,793], ce qui suggérerait un lien entre l'initiation de la sénescence et l'hypothétique complexe p21/PRDX2. De même, PHB2 et THOC5 sont impliqués dans l'induction de la différenciation, l'un négativement [743] et l'autre positivement [794], renforçant l'hypothèse d'une interaction avec p21 lors de la régulation de l'entrée en différenciation. Parmi les partenaires, l'annexine A2 présente de nombreux intérêts, parce qu'elle possède de nombreuses fonctions communes avec p21 ; l'intérêt de l'interaction, si elle est avérée, a

précédemment été discuté : ANXA2 et p21 pourraient agir de concert dans l'initiation de la sénescence, de la différenciation, dans l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'infection virale.

Enfin, le double hybride de p21 a permis d'envisager l'existence de complexes d'interactions protéiniques plus importants. L'analyse de la littérature des partenaires mis en évidence montre qu'ANXA2 interagit avec PHB1 et PHB2 [661]. Or, comme nous l'avons démontré, p21 interagit avec PHB2, et nous supposons que la présence de PHB1 au sein du complexe est possible. Nous pouvons proposer l'hypothèse de la formation d'un complexe ANXA2/PHB1/PHB2/p21. IL en est de même avec la calpaïne : la calpaïne interagit avec cdk4, partenaire de p21. L'existence d'un complexe calpaïne/cdk4/p21 est possible, mais nous pouvons également envisager une compétition de la calpaïne et de p21 pour la liaison à cdk4, compte tenu des études montrant une régulation positive de la prolifération par la calpaïne [680].

L'étude de la littérature traitant des candidats potentiels peut également laisser supposer de nouvelles fonctions de la protéine ou d'un domaine d'intérêt, se traduisant par exemple par une variation de sa localisation. Dans le cas du double hybride de la partie C-terminale de STAT3, les candidats obtenus n'ont pas tous une activité transcriptionnelle et la majorité est cytoplasmique. Or, le domaine de transactivation de STAT3 serait impliqué uniquement dans la modulation de la transcription des gènes cibles dans le noyau. Cette étude, appuyée par la littérature, laisse entrevoir l'hypothèse d'une fonction de ce domaine dans le cytoplasme, notamment *via* la mise en évidence de certains partenaires potentiels comme BTG3 et PRAS40. Le domaine de transactivation de STAT3 est activé par phosphorylation de la sérine 727, induisant ses fonctions transcriptionnelles *in vivo*. Cette activation n'a pas lieu dans la bactérie. Pour autant, nous ne pouvons pas déterminer si les interactions entre les candidats cytoplasmiques obtenus et STAT3-Cter sont automatiquement chimériques. En effet, les interactions se produisant entre domaines, la partie C-terminale de STAT3 peut avoir un rôle dans le cytoplasme sans avoir été phosphorylée sur la sérine 727. Cette étude, par la mise en évidence de nombreux partenaires potentiels cytoplasmiques, pourrait servir de préambule à l'étude de ce domaine dans le cytoplasme. Toutefois, ces interactions n'ont pas encore été confirmées *in vivo*. De plus, de récentes études montrent une localisation mitochondriale de STAT3 [324,325] et certaines protéines retrouvées dans le double hybride

sont également localisées dans la mitochondrie (ATP5G3, CHCHD2, COX7C, DGUOK, MTCH1, IDH3G et MGST1). La vérification de l'existence de ces interactions permettrait éventuellement de confirmer le rôle de STAT3 dans la mitochondrie.

Le double hybride permettrait aussi d'approfondir les relations entre les protéines et les régulations qui en découlent. Nous avons mis en évidence la possibilité d'une interaction de la partie C-terminale de STAT3 avec les protéines séquestosome 1 (SQSTM1) et PRELP. Ces 2 protéines présentent un lien avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B : PRELP interagit avec NF- $\kappa$ B et inhibe sa liaison à l'ADN, tandis que SQSTM1 active NF- $\kappa$ B et atténue l'expression des cytokines. STAT3 et NF- $\kappa$ B sont tous 2 impliqués dans la tumorigenèse et dans l'inflammation [335,337]. STAT3 entre en compétition avec NF- $\kappa$ B au niveau de la liaison à l'ADN et régule son recrutement [795,796]. Les interactions potentielles ou avérées SQSTM1/ NF- $\kappa$ B, PRELP/ NF- $\kappa$ B, SQSTM1/STAT3 et PRELP/STAT3 permettraient d'envisager un modèle de régulation de l'activité de NF- $\kappa$ B par STAT3, ou de STAT3 par NF- $\kappa$ B.

Nous avons vu que la présence de cibles communes dans les doubles hybrides pouvaient relever d'interactions non spécifiques, notamment lorsque les partenaires potentiels ont des fonctions métaboliques. De la même manière que nous ne pouvons pas affirmer que des interactions détectées existent *in vivo*, nous ne pouvons éliminer définitivement d'autres interactions a priori, bien qu'elles ne présentent pas un intérêt immédiat. La plupart des protéines ont de multiples fonctions et localisations qui ne sont pas exhaustivement répertoriées pour toutes les protéines. p21 et STAT3 ont des fonctions opposées, néanmoins d'après ce travail la granuline interagirait avec les 2 protéines. Bien qu'impliquée dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses [428], la granuline est une protéine sécrétée, ce qui rend apparemment impossible son interaction fonctionnelle avec p21 et STAT3. Toutefois, elle est synthétisée sous forme de précurseur ayant également une localisation intracellulaire. La forme intracellulaire peut être complexée avec le facteur positif d'élongation de la transcription P-TEFb, aboutissant à la répression de la transcription du promoteur HIV-1, mais aussi de la transcription de *c-myc* ; par contre, la transcription de *PCNA* n'est pas affectée. De plus, les granulines répriment l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription c-myc. La granuline intracellulaire serait un répresseur spécifique de la transcription modulant les fonctions de facteurs de transcription viraux et cellulaires [797].

La protéine c-myc est un oncogène dont la transcription est stimulée par STAT3 [293] et parallèlement réprimée par p21 [292]. D'après la littérature, la granuline et/ou son précurseur stimulent la progression tumorale par activation de la prolifération ; la granuline stimule la synthèse de la cycline D1 [798] mais réprime l'activation transcriptionnelle de c-myc. L'hypothèse d'une interaction entre GRN et p21 ou entre GRN et STAT3-Cter est envisageable, ce qui pourrait éclairer le lien entre ses fonctions protumorales et l'inhibition de la transcription de c-myc.

Initialement, ce projet a été mis en œuvre afin de croiser les informations recueillies sur les protéines de stress SAP et sur les modulateurs p21 et STAT3, et ce pour appréhender les fonctions des protéines d'intérêt et leur possible lien chez l'Homme et chez *Medicago truncatula*. L'analyse des doubles hybrides nous a permis de mettre en évidence une probable implication commune de MtSAP1, de p21 et de STAT3 dans un processus spécifique : la réponse au stress oxydatif. En effet, les 3 protéines d'intérêt sont sensibles à ce stress et de nombreuses cibles identifiées participent à la régulation du stress oxydatif. L'expression et les fonctions de p21 comme de STAT3 sont sensibles à ce type de stress : p21 est impliqué dans la régulation du taux de ROS générés [799], protège la cellule contre l'hypoxie en inhibant l'induction de l'apoptose [800,801], et l'absence de STAT3 sensibilise les cellules au stress oxydatif [802]. De même, l'expression de MtSAP1 est augmentée sous stress hypoxique et l'étude fonctionnelle du gène ainsi que les résultats du double hybride suggèrent que MtSAP1 participerait à la perception du taux de ROS intracellulaires, aboutissant à une détoxification de la cellule.

Parmi les séquences cibles analysées, des séquences codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif ont été retrouvées dans les 3 doubles hybrides. MtSAP1 interagirait avec AGP, GAPDH et HR, toutes 3 liées à la protection de la cellule en réponse à ces stress [217,231,232]. p21 se lierait à PGES2, COX15, CAPNS1, aux sous-unités de la ferritine et aux peroxyredoxines 1 et 2, également impliquées dans la protection cellulaire [439,465,680,688,697]. STAT3-Cter interagirait aussi avec des protéines protectrices : ATF4, DDB2, ANXA1, ALDH3A1, GPX1, MGST1, SOD3, les sous-unités de la ferritine et les peroxyredoxines [365,371,426,439,461,465,491]. La présence de partenaires communs entre p21 et STAT3-Cter (peroxyredoxines et ferritine) confirme l'importance du rôle de ces protéines dans la réponse au stress oxydatif. Les peroxyredoxines sont des protéines anti-

tumorales activées suite à des stress, notamment oxydatifs. Elles régulent le potentiel redox de la cellule et protègent les tissus en éliminant les peroxydes générés par le métabolisme ; ainsi elles régulent la concentration intracellulaire d' $H_2O_2$ . Leur production est générée suite à divers stress, biotiques ou abiotiques, et font partie des mécanismes de défense antioxydants des plantes. Dans les conditions physiologiques, elles modulent la signalisation redox durant le développement et l'adaptation des plantes à leur environnement, et protègent l'ADN de dommages [803,804].

Le stress oxydatif est un facteur majeur de l'inflammation et les dommages liés à ce stress sont dépendants du taux de fer, puisqu'un excès de fer induit la production de ROS très réactifs *via* la réaction de Fenton. La ferritine est une protéine de stockage du fer intracellulaire, et joue donc un rôle central dans la régulation du taux ferrique intracellulaire. La ferritine possède des liens très étroits avec la protection cellulaire face aux dommages oxydatifs. Elle est produite en phase aigüe et son expression est augmentée dans des conditions de prolifération incontrôlée, de production excessive de ROS et durant l'inflammation et les infections [805]. Elle protégerait la cellule en séquestrant le fer dans la cellule [806]. Bien qu'ayant les mêmes fonctions chez les plantes et chez l'Homme et étant sensible à un taux excessif de fer, la ferritine est régulée au niveau transcriptionnel chez les plantes, alors que sa régulation est post-transcriptionnelle chez les animaux [807]. Chez l'Homme, le suppresseur de tumeur p53 est induit en absence de fer et contrôle le taux de ROS. Lee *et al.* démontre que la ferritine interagit avec p53 sous stress oxydatif, mais également qu'elle augmente l'expression et l'activité transcriptionnelle de p53. De plus, l'absence de ferritine induit un retard d'induction des gènes cibles de p53 en réponse aux dommages oxydatifs [808]. STAT3 est un médiateur de l'inflammation et p21 un gène cible de p53, et tous 2 sont impliqués dans la réponse aux stress oxydatifs. L'hypothèse d'une interaction avec la ferritine est donc tout à fait envisageable.

Les orthologues de MtSAP1 chez l'Homme décrits dans la littérature sont AWP1 et ZNF216. La transcription de *ZNF216* est induite par les cytokines pro-inflammatoires  $TNF\alpha$  et  $IL-11\beta$ , qui stimulent l'activation de STAT3 [244,297,809] et régulent NF- $\kappa$ B. STAT3 entre en compétition avec NF- $\kappa$ B au niveau de la liaison à l'ADN et régule son recrutement. Le  $TNF\alpha$  stimule plusieurs voies de signalisation intracellulaires, induisant la génération de ROS et donc un stress oxydatif selon les stimuli extracellulaires [810,811]. Le rôle de NF- $\kappa$ B

lors d'un stress oxydatif ou une ischémie est peu déterminé : suite à une ischémie ce facteur de transcription est activé et transloqué dans le noyau. Toutefois, le type de contrôle qu'il exerce sur la réponse au stress différencierait selon les cellules [812,813]. De plus, l'activité de NF- $\kappa$ B est régulée négativement par la protéine IKK et ZNF216 se lie à IKK pour inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$  et l'IL-11 [109]. Enfin, MtSAP1 interagirait avec HR, orthologue de HIF-1 $\alpha$  et NF- $\kappa$ B régule la transcription de celui-ci induite par le TNF $\alpha$ . Lors d'une stimulation par le TNF $\alpha$ , la signalisation intracellulaire peut aboutir à l'activation de l'expression de p21 puis à la sénescence [811,814], mais également à une apoptose passant par la protéolyse de p21 [810]. Ces données nous permettent de supposer l'existence d'un lien entre les protéines p21, SAP, HR, STAT3 et NF- $\kappa$ B lors d'un stress hypoxique induit par le TNF $\alpha$ . Le modèle suivant proposé est totalement hypothétique, il découle des informations de la littérature et n'a pas de preuve expérimentale. La stimulation par le TNF $\alpha$  générerait des ROS, activerait STAT3 et ZNF216. ZNF216 inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B en se liant à IKK, STAT3 se lierait aux promoteurs des gènes cibles, en empêchant parallèlement le recrutement de NF- $\kappa$ B par compétition pour le promoteur. Ainsi, ZNF216 et STAT3 participeraient à l'inhibition de la régulation de la transcription de HIF-1 $\alpha$  par NF- $\kappa$ B, menant à l'expression de HIF-1 $\alpha$  ; HIF-1 $\alpha$  permettrait l'établissement des systèmes physiologiques régulant le stress hypoxique, notamment par sa liaison avec ZNF216. Parallèlement, l'inhibition de NF- $\kappa$ B restaurerait le taux de p21 nécessaire au contrôle du taux de ROS intracellulaires [799]. Bien que ce modèle soit totalement hypothétique, il pourrait être envisagé de le transposer chez les plantes, ce qui permettrait de mettre en évidence les orthologues correspondants, de confirmer le rôle de MtSAP1 dans ces processus et d'approfondir les connaissances sur la tolérance des plantes aux stress hypoxiques.

Enfin, il est intéressant de noter qu'une protéine régulatrice du stress oxydatif est retrouvée dans les 3 doubles hybrides : la cyclophiline A (PPIA). Chez *Medicago truncatula*, beaucoup de séquences identifiées codent des protéines inconnues ou dont les fonctions dans la réponse aux stress sont inconnues, et PPIA en fait partie. Nous avons choisi d'écarter les protéines redondantes entre les 3 études des candidats à une vérification de l'interaction, et notamment la cyclophiline A. En effet, cette protéine est conservée dans toutes les espèces et appartient au métabolisme de la bactérie : a priori l'interaction semble aspécifique. La fonction de PPIA dans la plante à la réponse au stress est inconnue, elle est définie comme une chaperonne aidant au repliement correct des protéines néosynthétisées. Nonobstant, les travaux sur les orthologues de ces protéines inconnues peuvent apporter quelques réponses sur les mécanismes de réponse à l'hypoxie, notamment *via* leurs interactions protéiniques. La

cyclophiline A (PPIA) chez l'Homme favorise l'inflammation, processus impliquant STAT3, et est activée en réponse aux stress oxydatifs, comme p21 et ZNF216 [815]. De plus, chez les plantes, la régénération la cyclophiline A facilite la régénération des peroxyredoxines [816]. Ces travaux ont permis de renforcer l'hypothèse d'un rôle de la cyclophiline A au cours des processus tumoraux mais également d'appréhender de probables fonctions chez *Medicago truncatula*. Bien qu'il soit peu vraisemblable que les complexes PPIA/p21, PPIA/STAT3-Cter et PPIA/MtSAP1 existent simultanément chez *Medicago truncatula*, l'existence de ces interactions au cours des stress oxydatifs seraient à envisager. D'une part, la présence du complexe PPIA/MtSAP1 orienterait les 2 protéines vers des fonctions liées au stress oxydatif, et d'autre part, l'étude de PPIA chez *Medicago truncatula* en réponse à ce stress pourrait peut être aboutir à la caractérisation des orthologues de p21 et de STAT3 chez ce modèle.

**CONCLUSIONS GENERALES  
& PERSPECTIVES.**

Cette étude avait pour but une meilleure compréhension des fonctions des protéines d'intérêt MtSAP1, STAT3 et p21, par l'étude de leurs interactions protéine-protéine. Dans ce travail nous avons réalisé 3 doubles hybrides bactériens pour mettre en évidence des interactions entre les protéines d'intérêt et des protéines exprimées dans les cellules de l'organisme concerné.

Le premier double hybride a été réalisé pour mettre en évidence les fonctions de MtSAP1 dans la graine mature, dont le rôle est mal déterminé. L'étude fonctionnelle du gène que nous avons réalisé dans un premier temps montre une sensibilité de *MtSAP1* à divers stress abiotiques, notamment lors d'un traitement avec une hormone anti-germinative, l'acide abscissique, ou lors d'un stress hypoxique. Sous ces conditions, l'expression de la protéine est induite, suggérant l'implication de MtSAP1 dans ces processus. Dans un second temps nous avons analysé les partenaires potentiels de MtSAP1 obtenus par double hybride bactérien. Parmi eux, 3 ont retenu notre attention au vu des fonctions de leurs orthologues décrites dans la littérature : MBF, DREB et HR. Ces deux études nous ont permis d'émettre une hypothèse modélisée sur les fonctions de MtSAP1. L'expression de MtSAP1 serait induite sous stress abiotique, notamment oxydatif, aboutissant à son interaction avec d'une part MBF dans le cytoplasme afin d'inhiber les voies de signalisation régulée par MBF, et d'autre part avec DREB et HR dans le noyau afin d'induire l'expression de protéines de détoxification, les 2 systèmes aboutissant à la protection de la cellule contre ces stress. Des expériences ultérieures nous permettront de confirmer ces interactions, la localisation subcellulaire et les fonctions de MtSAP1.

Nous avons utilisé le domaine C-terminal de STAT3 ainsi que la banque d'ADNc humaine pour réaliser le second double hybride bactérien. Le domaine C-terminal de STAT3 étant lié à l'activité transcriptionnelle de la protéine, nous proposons parmi les nouveaux partenaires potentiels 3 protéines cibles comme candidats à une étude approfondie immédiate : ATF4, DDB2 et USF1. L'interaction entre DDB2 et STAT3 *in vivo* a été confirmée par Sandy Courapied de l'équipe de recherche du Centre Paul Papin. Ces 3 protéines sont localisées dans le noyau. ATF4 est un facteur de transcription à activité oncogénique dont les fonctions sont similaires à celle de STAT3 : stimulation des processus métastatiques, de l'angiogenèse et de la survie sous hypoxie. Les fonctions de d'ATF4 dans la survie sous hypoxie et l'autophagie suggère un rôle de STAT3 dans ces phénomènes en lien avec cette interaction. USF1 serait un facteur de transcription anti-tumoral et DDB2 est une protéine de réparation de l'ADN capable d'activer l'apoptose. L'interaction de ces protéines avec STAT3 semble intéressante dans la compréhension des mécanismes de transformation

néoplasique. Dans un premier temps, la vérification de l'existence des interactions *in vivo* devrait être effectuée pour pouvoir étudier par la suite l'implication de ces complexes dans la tumorigenèse. De plus, la découverte de certains partenaires comme BTG3 ou PRAS40 suggère l'implication du domaine C-terminal dans le cytoplasme, hypothèse qu'il sera intéressant de vérifier en parallèle.

Le dernier double hybride a donc été réalisé avec p21 comme protéine d'intérêt et la banque humaine comme cible. Parmi les nombreux partenaires mis en évidence, certains confirment le rôle de p21 dans l'infection virale ; cependant, nous proposons 4 partenaires potentiels comme candidats à une étude ultérieure : l'annexine A2, impliquée dans les mêmes processus que p21, les peroxyredoxines 1 et 2, suppresseur de tumeur, et la prohibitine 2 (PHB2), que nous avons choisi d'étudier. L'étude ultérieure des peroxyredoxines et de l'annexine A2 pourrait apporter des informations supplémentaires sur les fonctions de p21, notamment au niveau de l'apoptose et de la sénescence, 2 processus dans lesquels l'action de p21 est mal connue. PHB2 a été retenue au vu de ses possibles implications dans l'arrêt de la prolifération et de la différenciation, mais également parce qu'elle est fortement surexprimée dans des tumeurs colorectales de patients. Au cours de ce travail nous avons vérifié l'existence de l'interaction entre p21 et PHB2 *in vivo* et nous avons déterminé les domaines impliqués. Toutefois nous n'avons pas pu mettre en évidence le rôle de ce complexe dans les mécanismes tumoraux. Le complexe p21/PHB2 pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité de facteurs de transcription comme le récepteur aux œstrogènes alpha, dans la régulation de l'expression de l'oncogène c-myc et/ou dans la dégradation de p21 par le protéasome. Ces hypothèses devraient être vérifiées en premier lieu, notamment en utilisant un modèle de cellules cancéreuses du sein, où ce récepteur est fortement exprimé. Par la suite, les conséquences physiologiques de cette interaction devraient être observées, permettant de comprendre comment p21 engage la cellule vers la différenciation ou l'apoptose, par exemple.

Nous avons réalisé les doubles hybrides des protéines d'intérêt en ayant 2 objectifs : le premier était d'approfondir les connaissances sur les fonctions de chaque protéine d'intérêt dans le modèle concerné, et le second était de croiser les informations obtenues afin d'établir un lien fonctionnel entre les protéines d'intérêt au cours des stress. L'analyse des partenaires nous a permis de mettre en évidence une implication commune de MtSAP1, de p21 et de STAT3 dans un processus spécifique : la réponse au stress oxydatif. Toutes les cellules sont

sensibles à la concentration en oxygène. Notamment, la prolifération tumorale induit une hypoxie perçue par les cellules et impliquant STAT3 et p21. Dans les 3 doubles hybrides, de nombreuses protéines impliquées dans la réponse cellulaire au stress oxydatif ont été mises en évidence (HR, peroxyredoxines, PPIA en sont quelques exemples). Parmi elles, la cyclophiline A (PPIA) est retrouvée dans les 3 doubles hybrides. De plus, l'étude de la littérature concernant les protéines d'intérêt, les cibles et les orthologues de celles-ci a permis d'émettre l'hypothèse d'une relation entre les activités de p21, STAT3 et MtSAP1 dans la cellule humaine en condition hypoxique, notamment *via* la régulation de NF- $\kappa$ B. Les orthologues de p21 et de STAT3 sont peu connus chez les plantes, et inversement l'orthologue de MtSAP1 mal connu chez l'Homme. Ce travail permet donc d'ouvrir de nombreuses perspectives quant aux fonctions de ces protéines et devrait permettre de transposer les informations sur la régulation des stress oxydatifs recueillies dans un modèle vers le second modèle. Les études ultérieures pourront utiliser ces résultats afin de croiser les informations obtenues : la réalisation de double hybride entre une protéine d'intérêt d'un organisme et la banque de l'autre organisme pourrait être faite pour approfondir les mécanismes liés à ce stress et pour déterminer les rôles exacts des orthologues de p21 et de STAT3 chez les plantes d'une part, et de MtSAP1 chez l'Homme d'autre part.

Cette étude nous a permis de montrer que le double hybride bactérien apportait rapidement de nombreuses informations. L'étude des interactions entre protéines peut permettre d'envisager de nouvelles fonctions de la protéine d'intérêt ou de la protéine cible, d'approfondir les mécanismes moléculaires impliqués, de définir simultanément des interactions existantes dans plusieurs phénomènes cellulaires, de mettre en évidence des complexes protéiques de plus de 2 protéines voire de supposer de nouvelles fonctions d'un domaine particulier. L'application la plus intéressante du double hybride reste néanmoins la détermination de fonctions de la protéine d'intérêt. En conclusion, le double hybride bactérien s'utilise comme point de départ d'une étude fonctionnelle des interactions protéiques et représente un outil puissant pouvant suggérer des implications au-delà du mécanisme étudié initialement.

## **BIBLIOGRAPHIE.**

- [1] (2000) *Nature* 408, 796-815.
- [2] (2004) *Nature* 431, 931-945.
- [3] Giot, L. et al. (2003) *Science (New York, N.Y.)* 302, 1727-1736.
- [4] Karimova, G., Ladant, D. and Ullmann, A. (2002) *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 292, 17-25.
- [5] Park, S.H. and Raines, R.T. (2000) *Nature Biotechnology* 18, 847-851.
- [6] Vidal, M. and Endoh, H. (1999) *Trends in Biotechnology* 17, 374-381.
- [7] Flores, A. et al. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 7815-7820.
- [8] Flajolet, M., Rotondo, G., Daviet, L., Bergametti, F., Inchauspé, G., Tiollais, P., Transy, C. and Legrain, P. (2000) *Gene* 242, 369-379.
- [9] Ito, T., Ota, K., Kubota, H., Yamaguchi, Y., Chiba, T., Sakuraba, K. and Yoshida, M. (2002) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 1, 561-566.
- [10] Ito, T. et al. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1143-1147.
- [11] Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. (2000) *Nature Biotechnology* 18, 1257-1261.
- [12] Uetz, P. et al. (2000) *Nature* 403, 623-627.
- [13] Jensen, L.J. et al. (2009) *Nucleic Acids Research* 37, D412-416.
- [14] Hermjakob, H. et al. (2004) *Nucleic Acids Research* 32, D452-455.
- [15] Zanzoni, A., Montecchi-Palazzi, L., Quondam, M., Ausiello, G., Helmer-Citterich, M. and Cesareni, G. (2002) *FEBS Letters* 513, 135-140.
- [16] Gilbert, D. (2005) *Briefings in Bioinformatics* 6, 194-198.
- [17] Hoffmann, R. and Valencia, A. (2004) *Nature Genetics* 36, 664.
- [18] Breitkreutz, B.-J. et al. (2008) *Nucleic Acids Research* 36, D637-640.
- [19] Salwinski, L., Miller, C.S., Smith, A.J., Pettit, F.K., Bowie, J.U. and Eisenberg, D. (2004) *Nucleic Acids Research* 32, D449-451.
- [20] Ng, S.-K., Zhang, Z., Tan, S.-H. and Lin, K. (2003) *Nucleic Acids Research* 31, 251-254.
- [21] Ng, K.-L., Huang, C.-H., Liu, H.-C. and Liu, H.-C. (2008) *Computational Biology and Chemistry* 32, 81-87.
- [22] Matthews, L. et al. (2009) *Nucleic Acids Research* 37, D619-622.
- [23] Vastrik, I. et al. (2007) *Genome Biology* 8, R39.
- [24] Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995) *Microbiological Reviews* 59, 94-123.
- [25] Suter, B., Kittanakom, S. and Stagljar, I. (2008) *BioTechniques* 44, 681-691.
- [26] Miller, K.G., Field, C.M., Alberts, B.M. and Kellogg, D.R. (1991) *Methods in Enzymology* 196, 303-319.
- [27] Glenney, J.R., and K. Weber. (1993) *Methods in enzymology* 102, 204-210.
- [28] Sikela, J.M. and Hahn, W.E. (1987) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 3038-3042.
- [29] Poltorak, A., Peppel, K. and Beutler, B. (1994) *Journal of Immunological Methods* 169, 93-99.
- [30] Söderberg, O. et al. (2007) *Genetic Engineering* 28, 85-93.
- [31] Bakker, O., van Beeren, H.C., Emrich, T., Höltske, H. and Wiersinga, W.M. (1999) *Analytical Biochemistry* 276, 105-106.
- [32] Fodor, S.P., Rava, R.P., Huang, X.C., Pease, A.C., Holmes, C.P. and Adams, C.L. (1993) *Nature* 364, 555-556.
- [33] Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) *Science (New York, N.Y.)* 270, 467-470.
- [34] Bertone, P. and Snyder, M. (2005) *The FEBS Journal* 272, 5400-5411.

- [35] Kersten, B. and Feilner, T. (2007) *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 355, 365-378.
- [36] Babel, I., Barderas, R., Díaz-Uriarte, R., Martínez-Torrecedrada, J.L., Sánchez-Carbayo, M. and Casal, J.I. (2009) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 8, 2382-2395.
- [37] Madoz-Gúrpide, J., Kuick, R., Wang, H., Misek, D.E. and Hanash, S.M. (2008) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 7, 268-281.
- [38] Phizicky, E., Bastiaens, P.I.H., Zhu, H., Snyder, M. and Fields, S. (2003) *Nature* 422, 208-215.
- [39] Sreekumar, A., Nyati, M.K., Varambally, S., Barrette, T.R., Ghosh, D., Lawrence, T.S. and Chinnaiyan, A.M. (2001) *Cancer Research* 61, 7585-7593.
- [40] Hall, D.A., Ptacek, J. and Snyder, M. (2007) *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 161-167.
- [41] Zhu, H. et al. (2001) *Science* (New York, N.Y.) 293, 2101-2105.
- [42] Feilner, T. and Kersten, B. (2007) *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 355, 379-390.
- [43] Speer, R., Wulfkühle, J.D., Liotta, L.A. and Petricoin, E.F. (2005) *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 7, 240-245.
- [44] MacBeath, G. and Schreiber, S.L. (2000) *Science* (New York, N.Y.) 289, 1760-1763.
- [45] Stoevesandt, O., Taussig, M.J. and He, M. (2009) *Expert Review of Proteomics* 6, 145-157.
- [46] Templin, M.F., Stoll, D., Schwenk, J.M., Pötz, O., Kramer, S. and Joos, T.O. (2003) *Proteomics* 3, 2155-2166.
- [47] Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y. and Lenardo, M.J. (2000) *Science* (New York, N.Y.) 288, 2354-2357.
- [48] Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J. and Roninson, I.B. (1999) *Oncogene* 18, 4808-4818.
- [49] Hu, C.-D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2002) *Molecular Cell* 9, 789-798.
- [50] Suchanek, M., Radzikowska, A. and Thiele, C. (2005) *Nature Methods* 2, 261-267.
- [51] Scott, J.K. and Smith, G.P. (1990) *Science* (New York, N.Y.) 249, 386-390.
- [52] Nickels, B.E. (2009) *Methods* 47, 53-62.
- [53] Joung, J.K., Ramm, E.I. and Pabo, C.O. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7382-7387.
- [54] Fields, S. and Song, O. (1989) *Nature* 340, 245-246.
- [55] Parrish, J.R., Gulyas, K.D. and Finley, R.L. (2006) *Current Opinion in Biotechnology* 17, 387-393.
- [56] Dhayalan, A., Jurkowski, T.P., Laser, H., Reinhardt, R., Jia, D., Cheng, X. and Jeltsch, A. (2008) *Journal of Molecular Biology* 376, 1091-1099.
- [57] Kim, J.Y., Park, O.G., Lee, J.W. and Lee, Y.C. (2007) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 6, 1727-1740.
- [58] Bennett, M.A., Shern, J.F. and Kahn, R.A. (2004) *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 261, 313-326.
- [59] Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and te Heesen, S. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5187-5192.
- [60] Möckli, N., Deplazes, A., Hassa, P.O., Zhang, Z., Peter, M., Hottiger, M.O., Stagljar, I. and Auerbach, D. (2007) *BioTechniques* 42, 725-730.
- [61] Urech, D.M., Lichtlen, P. and Barberis, A. (2003) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1622, 117-127.
- [62] Guo, D., Hazbun, T.R., Xu, X.-J., Ng, S.-L., Fields, S. and Kuo, M.-H. (2004) *Nature Biotechnology* 22, 888-892.

- [63] Li, J.J. and Herskowitz, I. (1993) *Science* (New York, N.Y.) 262, 1870-1874.
- [64] Licitra, E.J. and Liu, J.O. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12817-12821.
- [65] Serebriiskii, I.G. et al. (2002) *Genome Research* 12, 1785-1791.
- [66] Joshi, P.B., Hirst, M., Malcolm, T., Parent, J., Mitchell, D., Lund, K. and Sadowski, I. (2007) *BioTechniques* 42, 635-644.
- [67] Lentze, N. and Auerbach, D. (2008) *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12, 505-515.
- [68] Rual, J.-F. et al. (2005) *Nature* 437, 1173-1178.
- [69] Stelzl, U. et al. (2005) *Cell* 122, 957-968.
- [70] Lim, J. et al. (2006) *Cell* 125, 801-814.
- [71] Oeffner, F., Moch, C., Neundorff, A., Hofmann, J., Koch, M. and Grzeschik, K.H. (2008) *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65, 143-155.
- [72] Kaltenbach, L.S. et al. (2007) *PLoS Genetics* 3, e82.
- [73] Albers, M., Kranz, H., Kober, I., Kaiser, C., Klink, M., Suckow, J., Kern, R. and Koegl, M. (2005) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 4, 205-213.
- [74] Wong, J. et al. (2007) *Molecular Biology of the Cell* 18, 3800-3809.
- [75] Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H. and Zhu, L. (1997) *BioTechniques* 22, 350-352.
- [76] Lim, Y.-P. and Huang, J.-D. (2007) *Pharmacogenetics and Genomics* 17, 369-382.
- [77] Wehr, M.C. et al. (2006) *Nature Methods* 3, 985-993.
- [78] Eyckerman, S., Verhee, A., der Heyden, J.V., Lemmens, I., Ostade, X.V., Vandekerckhove, J. and Tavernier, J. (2001) *Nature Cell Biology* 3, 1114-1119.
- [79] Dove, S.L. and Hochschild, A. (1998) *Genes & Development* 12, 745-754.
- [80] Dove, S.L., Joung, J.K. and Hochschild, A. (1997) *Nature* 386, 627-630.
- [81] Hochschild, A. and Dove, S.L. (1998) *Cell* 92, 597-600.
- [82] Joung, J.K. (2001) *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* 37, 53-57.
- [83] Hu, J.C., Kornacker, M.G. and Hochschild, A. (2000) *Methods* (San Diego, Calif.) 20, 80-94.
- [84] Dove, S.L. and Hochschild, A. (2004) *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 261, 231-246.
- [85] Hays, L.B., Chen, Y.S. and Hu, J.C. (2000) *BioTechniques* 29, 288-290, 292, 294 passim.
- [86] Di Lallo, G., Castagnoli, L., Ghelardini, P. and Paolozzi, L. (2001) *Microbiology* (Reading, England) 147, 1651-1656.
- [87] Ladant, D. and Karimova, G. (2000) *Research in Microbiology* 151, 711-720.
- [88] Clarke, P., Cuív, P.O. and O'Connell, M. (2005) *Nucleic Acids Research* 33, e18.
- [89] Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. and Ladant, D. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5752-5756.
- [90] Franssen, M., Brees, C., Ghys, K., Amery, L., Mannaerts, G.P., Ladant, D. and Van Veldhoven, P.P. (2002) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 1, 243-252.
- [91] Adyshev, D.M., Kolosova, I.A. and Verin, A.D. (2006) *Molecular Biology Reports* 33, 83-89.
- [92] Brieger, A., Plotz, G., Zeuzem, S. and Trojan, J. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364, 731-736.
- [93] Workentine, M.L., Chang, L., Ceri, H. and Turner, R.J. (2009) *FEMS Microbiology Letters* 292, 50-56.
- [94] Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Séraphin, B. (2001) *Methods* (San Diego, Calif.) 24, 218-229.
- [95] Suter, B. et al. (2007) *Genome Research* 17, 1774-1782.
- [96] Selbach, M. and Mann, M. (2006) *Nature Methods* 3, 981-983.

- [97] Barrios-Rodiles, M. et al. (2005) *Science* (New York, N.Y.) 307, 1621-1625.
- [98] Clark, W.A., Jian, X., Chen, L. and Northup, J.K. (2001) *The Biochemical Journal* 358, 389-397.
- [99] Goldmann, W.H., Guttenberg, Z., Kaufmann, S., Hess, D., Ezzell, R.M. and Isenberg, G. (1997) *European Journal of Biochemistry / FEBS* 250, 447-450.
- [100] Thompsett, A.R. and Brown, D.R. (2007) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1774, 920-927.
- [101] Amisaki, T., Toyoda, S., Miyagawa, H. and Kitamura, K. (2003) *Journal of Computational Chemistry* 24, 582-592.
- [102] Lawrence, H.R. et al. (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 3756-3759.
- [103] Bushell, K.M., Söllner, C., Schuster-Boeckler, B., Bateman, A. and Wright, G.J. (2008) *Genome Research* 18, 622-630.
- [104] Jayat, D., Gaudin, J.-C., Chobert, J.-M., Burova, T.V., Holt, C., McNae, I., Sawyer, L. and Haertlé, T. (2004) *Biochemistry* 43, 6312-6321.
- [105] Singh, H. (2007) *Le Lait* 87, 11 pages.
- [106] Baeza, R.I., Carp, D.J., Pérez, O.E. and Pilosof, A.M.R. (2002) *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 35, 741-747.
- [107] Wackerbarth, H., Stoll, T., Gebken, S., Pelters, C. and Bindrich, U. (2009) *Food Research International* 42, 1254-1258.
- [108] Bouton, S., Viau, L., Lelièvre, E. and Limami, A.M. (2005) *Journal of Experimental Botany* 56, 825-832.
- [109] Huang, J. et al. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 16847-16853.
- [110] Abbas, T. and Dutta, A. (2009) *Nature Reviews. Cancer* 9, 400-414.
- [111] Aggarwal, B.B., Kunnumakkara, A.B., Harikumar, K.B., Gupta, S.R., Tharakan, S.T., Koca, C., Dey, S. and Sung, B. (2009) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171, 59-76.
- [112] Boudet, J. (2005) in: UMR A\_1191 - Physiologie moléculaire des semences Angers Angers.
- [113] Bewley, J. (1979) *Annual review of Plant Physiology* 30, 195-238.
- [114] Leopold, A. (1986) (Press, C.U., Ed.), Ithaca, New-York.
- [115] Cleggs JS, C.F. (1980), Vol. 2 (Press, U., Ed.), Wetteren, Belgium.
- [116] Mattimore, V. and Battista, J.R. (1996) *J Bacteriol* 178, 633-7.
- [117] Buitink, J. and Leprince, O. (2008) *Comptes Rendus Biologies* 331, 788-795.
- [118] Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Tetteroo, F.A. and Wolkers, W.F. (2001) *Cryobiology* 43, 140-150.
- [119] Buitink, J., Leprince, O. and Hoekstra, F.A. (2000) *Plant Physiology* 124, 1413-1426.
- [120] Golovina, Hoekstra and Hemminga (1998) *Plant Physiology* 118, 975-986.
- [121] Hoekstra, F.A., Wolkers, W.F., Buitink, J., Golovina, E.A., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1997) *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117, 335-341.
- [122] Dure, L., Greenway, S.C. and Galau, G.A. (1981) *Biochemistry* 20, 4162-4168.
- [123] Galau, G.A., Hughes, D.W. and Dure, L. (1986) *Plant Molecular Biology* 7, 155-170.
- [124] Kermode, A. (1990) *SRC Crit Rev Plant Sci* 80, 280-288.
- [125] Ramanjulu, S. and Bartels, D. (2002) *Plant Cell Environ* 25, 141-151.
- [126] Skriver, K. and Mundy, J. (1990) *Plant Cell* 2, 503-12.
- [127] Dure, L. (1993) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 3, 363-369.
- [128] Close, T.J. (1996) *Physiologia Plantarum* 97, 795-803.
- [129] Buitink, J., Leprince, O., Hemminga, M.A. and Hoekstra, F.A. (2000) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2385-2390.

- [130] Wolkers, Tetteroo, Alberda and Hoekstra (1999) *Plant Physiology* 120, 153-164.
- [131] Goyal, K., Tisi, L., Basran, A., Browne, J., Burnell, A., Zurdo, J. and Tunnacliffe, A. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 12977-12984.
- [132] Abernethy, R.H., Thiel, D.S., Petersen, N.S. and Helm, K. (1989) *Plant Physiology* 89, 569-576.
- [133] Wehmeyer, N. and Vierling, E. (2000) *Plant Physiology* 122, 1099-1108.
- [134] Leprince, O., Harren, F.J., Buitink, J., Alberda, M. and Hoekstra, F.A. (2000) *Plant Physiology* 122, 597-608.
- [135] Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. (2006) *The New Phytologist* 171, 501-523.
- [136] Baskin, J.M. and Baskin, C.C. (2004) *Seed Science Research* 14, 1-16.
- [137] Hilhorst, H.W.M. (1995) *Seed Science Research* 5, 61-73.
- [138] Kucera, B., Cohn, M.A. and Leubner-Metzger, G. (2005) *Seed Science Research* 15, 281-307.
- [139] Krock, B., Schmidt, S., Hertweck, C. and Baldwin, I.T. (2002) *Seed Science Research* 12, 239-252.
- [140] Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Côme, D. and Corbineau, F. (2004) *Journal of Experimental Botany* 55, 475-483.
- [141] Bethke, P.C., Libourel, I.G.L. and Jones, R.L. (2006) *Journal of Experimental Botany* 57, 517-526.
- [142] Donohue, K. (2005) *Seed Science Research* 15, 175-187.
- [143] Leubner-Metzger, G. (2005) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41, 133-145.
- [144] Bove, J., Lucas, P., Godin, B., Ogé, L., Jullien, M. and Grappin, P. (2005) *Plant Molecular Biology* 57, 593-612.
- [145] Leymarie, J., Bruneaux, E., Gibot-Leclerc, S. and Corbineau, F. (2007) *Journal of Experimental Botany* 58, 425-437.
- [146] Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiha, T., Kamiya, Y. and Nambara, E. (2005) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 41, 697-709.
- [147] Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M. and Grappin, P. (2006) *Plant Physiology* 142, 1493-1510.
- [148] Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. and Job, D. (2004) *Plant Physiology* 134, 1598-1613.
- [149] Bewley J. Derek , B.M. (1994) (Press, P., Ed.), New-York.
- [150] Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L. and Holdsworth, M.J. (2008) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 53, 214-224.
- [151] Müller, K., Tintelnot, S. and Leubner-Metzger, G. (2006) *Plant & Cell Physiology* 47, 864-877.
- [152] Penfield, S., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Larson, T.R. and Graham, I.A. (2004) *The Plant Cell* 16, 2705-2718.
- [153] Hugouvieux, V., Kwak, J.M. and Schroeder, J.I. (2001) *Cell* 106, 477-487.
- [154] Reyes, J.L. and Chua, N.-H. (2007) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 49, 592-606.
- [155] Yoine, M., Nishii, T. and Nakamura, K. (2006) *Plant & Cell Physiology* 47, 572-580.
- [156] Zhang, J.-Y., Broeckling, C.D., Blancaflor, E.B., Sledge, M.K., Sumner, L.W. and Wang, Z.-Y. (2005) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 42, 689-707.
- [157] Mitchum, M.G. et al. (2006) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 45, 804-818.

- [158] Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M. and Matsuoka, M. (2008) *Trends in Plant Science* 13, 192-199.
- [159] Leubner-Metzger, G. (2001) *Planta* 213, 758-763.
- [160] Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. and Steber, C. (2008) *Annual Review of Plant Biology* 59, 387-415.
- [161] Liu, P.-P., Montgomery, T.A., Fahlgren, N., Kasschau, K.D., Nonogaki, H. and Carrington, J.C. (2007) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 52, 133-146.
- [162] Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Peer, W., Schmuths, H., Footitt, S., Theodoulou, F.L. and Holdsworth, M.J. (2007) *Plant Physiology* 143, 1669-1679.
- [163] Holdsworth, M.J., Bentsink, L. and Soppe, W.J.J. (2008) *The New Phytologist* 179, 33-54.
- [164] Raz, V., Bergervoet, J.H. and Koornneef, M. (2001) *Development (Cambridge, England)* 128, 243-252.
- [165] Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M. and Bellini, C. (2007) *Trends in Plant Science* 12, 294-300.
- [166] Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H.M. (1992) *The Plant Cell* 4, 1251-1261.
- [167] Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P. and Miséra, S. (1998) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 15, 755-764.
- [168] Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11806-11811.
- [169] Lotan, T. et al. (1998) *Cell* 93, 1195-1205.
- [170] Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C. and Yeung, E.C. (1994) *The Plant Cell* 6, 1049-1064.
- [171] To, A., Valon, C., Savino, G., Guillemint, J., Devic, M., Giraudat, J. and Parcy, F. (2006) *The Plant Cell* 18, 1642-1651.
- [172] Busk, P.K. and Pagès, M. (1998) *Plant Molecular Biology* 37, 425-435.
- [173] Himmelbach, A., Yang, Y. and Grill, E. (2003) *Current Opinion in Plant Biology* 6, 470-479.
- [174] Braybrook, S.A., Stone, S.L., Park, S., Bui, A.Q., Le, B.H., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. and Harada, J.J. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3468-3473.
- [175] Mönke, G., Altschmied, L., Tewes, A., Reidt, W., Mock, H.-P., Baumlein, H. and Conrad, U. (2004) *Planta* 219, 158-166.
- [176] Kroj, T., Savino, G., Valon, C., Giraudat, J. and Parcy, F. (2003) *Development (Cambridge, England)* 130, 6065-6073.
- [177] Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M. and Vachon, G. (2004) *Plant Physiology* 136, 3660-3669.
- [178] Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M. and McCourt, P. (2004) *Developmental Cell* 7, 373-385.
- [179] Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C.J. and Koornneef, M. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17042-17047.
- [180] Suzuki, M., Wang, H.H.Y. and McCarty, D.R. (2007) *Plant Physiology* 143, 902-911.
- [181] Tanaka, M., Kikuchi, A. and Kamada, H. (2008) *Plant Physiology* 146, 149-161.
- [182] Jiang, F. and Hartung, W. (2008) *J. Exp. Bot.* 59, 37-43.
- [183] van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. and Linthorst, H.J.M. (2006) *Trends in Plant Science* 11, 184-191.

- [184] Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) *Plant Physiology* 149, 88-95.
- [185] Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) *Journal of Experimental Botany* 58, 221-227.
- [186] Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H. and Park, O.K. (2004) *The Plant Cell* 16, 1378-1391.
- [187] Vinocur, B. and Altman, A. (2005) *Current Opinion in Biotechnology* 16, 123-132.
- [188] Dietz, K.-J. (2008) *Physiologia Plantarum* 133, 459-468.
- [189] Noctor, G. (2006) *Plant, Cell & Environment* 29, 409-425.
- [190] Mittler, R. (2002) *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- [191] Sunkar, R., Bartels, D. and Kirch, H.-H. (2003) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 35, 452-464.
- [192] Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. and Shigeoka, S. (2004) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 37, 21-33.
- [193] Capell, T. and Christou, P. (2004) *Current Opinion in Biotechnology* 15, 148-154.
- [194] Konstantinova Tatyana, P.D., ATANASSOV Atanas, DJILIANOV Dimitar (2002) *Plant science* 163, 157-164.
- [195] Abebe, T., Guenzi, A.C., Martin, B. and Cushman, J.C. (2003) *Plant Physiology* 131, 1748-1755.
- [196] Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R.J. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15898-15903.
- [197] Diatchenko, L. et al. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6025-6030.
- [198] Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2008) *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65, 1150-1160.
- [199] Davletova, S., Schlauch, K., Coutu, J. and Mittler, R. (2005) *Plant Physiology* 139, 847-856.
- [200] Mukhopadhyay, A., Vij, S. and Tyagi, A.K. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6309-6314.
- [201] Dixit, V.M. et al. (1990) *The Journal of Biological Chemistry* 265, 2973-2978.
- [202] Opiari, A.W., Boguski, M.S. and Dixit, V.M. (1990) *The Journal of Biological Chemistry* 265, 14705-14708.
- [203] Rebagliati, M.R., Weeks, D.L., Harvey, R.P. and Melton, D.A. (1985) *Cell* 42, 769-777.
- [204] Solanke, A.U., Sharma, M.K., Tyagi, A.K. and Sharma, A.K. (2009) *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 282, 153-164.
- [205] Vij, S. and Tyagi, A.K. (2006) *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 276, 565-575.
- [206] Vij, S. and Tyagi, A.K. (2008) *Functional & Integrative Genomics* 8, 301-307.
- [207] Diatchenko, L., Romanov, S., Malinina, I., Clarke, J., Tchivilev, I., Li, X. and Makarov, S.S. (2005) *Journal of Leukocyte Biology* 78, 1366-1377.
- [208] Duan, W., Sun, B., Li, T.W., Tan, B.J., Lee, M.K. and Teo, T.S. (2000) *Gene* 256, 113-121.
- [209] Hishiya, A., Iemura, S.-i., Natsume, T., Takayama, S., Ikeda, K. and Watanabe, K. (2006) *The EMBO Journal* 25, 554-564.
- [210] Ben Saad, R., Zouari, N., Ben Ramdhan, W., Azaza, J., Meynard, D., Guiderdoni, E. and Hassairi, A. (2009) *Plant Molecular Biology*.
- [211] Huang, J. et al. (2008) *Gene* 420, 135-144.

- [212] Ströher, E., Wang, X.-J., Roloff, N., Klein, P., Husemann, A. and Dietz, K.-J. (2009) *Molecular Plant* 2, 357-367.
- [213] Wertz, I.E. et al. (2004) *Nature* 430, 694-9.
- [214] Linnen, J.M., Bailey, C.P. and Weeks, D.L. (1993) *Gene* 128, 181-8.
- [215] Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999) *Nucleic Acids Res* 27, 297-300.
- [216] Lalonde, S., Morse, D. and Saini, H.S. (1997) *Plant Molecular Biology* 34, 445-453.
- [217] Weigelt, K. et al. (2009) *Plant Physiology* 149, 395-411.
- [218] Yan, S., Tang, Z., Su, W. and Sun, W. (2005) *Proteomics* 5, 235-244.
- [219] Boudet, J., Buitink, J., Hoekstra, F.A., Rogniaux, H., Larré, C., Satour, P. and Leprince, O. (2006) *Plant Physiology* 140, 1418-1436.
- [220] Agarwal, P.K., Agarwal, P., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2006) *Plant Cell Reports* 25, 1263-1274.
- [221] Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F. and Covarrubias, A.A. (2008) *Plant Physiology* 148, 6-24.
- [222] Lee, J.H., Chae, H.S., Lee, J.H., Hwang, B., Hahn, K.W., Kang, B.G. and Kim, W.T. (1997) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1354, 13-18.
- [223] Sánchez-Aguayo, I., Rodríguez-Galán, J.M., García, R., Torreblanca, J. and Pardo, J.M. (2004) *Planta* 220, 278-285.
- [224] Buchanan, C.D. et al. (2005) *Plant Molecular Biology* 58, 699-720.
- [225] Ko, J.-H., Yang, S.H. and Han, K.-H. (2006) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 47, 343-355.
- [226] Lee, D.-G., Ahsan, N., Lee, S.-H., Kang, K.Y., Lee, J.J. and Lee, B.-H. (2007) *Comptes Rendus Biologies* 330, 215-225.
- [227] Chen, X., Wang, Y., Li, J., Jiang, A., Cheng, Y. and Zhang, W. (2009) *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française De Physiologie Végétale* 47, 407-415.
- [228] Duranti, M., Scarafoni, A., Gius, C., Negri, A. and Faoro, F. (1994) *European Journal of Biochemistry / FEBS* 222, 387-393.
- [229] Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A. and Farmaki, T. (2008) *Journal of Experimental Botany* 59, 2043-2056.
- [230] Teixeira, M.C., Coelho, N., Olsson, M.E., Brodelius, P.E., Carvalho, I.S. and Brodelius, M. (2009) *Biotechnology Letters* 31, 1089-1101.
- [231] Baek, D. et al. (2008) *Phytochemistry* 69, 333-338.
- [232] Semenza, G.L. (2000) *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 88, 1474-1480.
- [233] Rerie, W.G., Whitecross, M. and Higgins, T.J. (1991) *Molecular & General Genetics: MGG* 225, 148-157.
- [234] Mauch, F. and Dudler, R. (1993) *Plant Physiology* 102, 1193-1201.
- [235] Sarkar, N.K., Kim, Y.-K. and Grover, A. (2009) *BMC Genomics* 10, 393.
- [236] Suzuki, N., Bajad, S., Shuman, J., Shulaev, V. and Mittler, R. (2008) *The Journal of Biological Chemistry* 283, 9269-9275.
- [237] Kim, M.-J., Lim, G.-H., Kim, E.-S., Ko, C.-B., Yang, K.-Y., Jeong, J.-A., Lee, M.-C. and Kim, C.S. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 354, 440-446.
- [238] Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V. and Mittler, R. (2005) *Plant Physiology* 139, 1313-1322.
- [239] Arce, D.P., Tonón, C., Zanetti, M.E., Godoy, A.V., Hirose, S. and Casalengué, C.A. (2006) *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39, 355-360.

- [240] Pamela Arce, D., Verónica Godoy, A., Tsuda, K., Yamazaki, K.-I., Marta Valle, E., José Iglesias, M., Di Mauro, M.F. and Anahí Casalongué, C. (2009) *Journal of Plant Physiology*.
- [241] Jones, A.M.E., Bennett, M.H., Mansfield, J.W. and Grant, M. (2006) *Proteomics* 6, 4155-4165.
- [242] Kanneganti, V. and Gupta, A.K. (2008) *Plant Molecular Biology* 66, 445-462.
- [243] Miotto, B. and Struhl, K. (2006) *Molecular and Cellular Biology* 26, 5969-5982.
- [244] Hishiya, A., Ikeda, K. and Watanabe, K. (2005) *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 25, 199-216.
- [245] Yang, X.-Y., Ren, C.-P., Wang, L., Li, H., Jiang, C.-J., Zhang, H.-B., Zhao, M. and Yao, K.-T. (2005) *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology* 27, 215-223.
- [246] Fenner, B.J., Scannell, M. and Prehn, J.H.M. (2009) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794, 1010-1016.
- [247] Görlach, A. and Bonello, S. (2008) *The Biochemical Journal* 412, e17-19.
- [248] Ballinger, A.B. and Anggiansah, C. (2007) *Bmj* 335, 715-8.
- [249] Chan, J.A. et al. (2008) *Jama* 299, 2515-23.
- [250] Lynch, H.T. and de la Chapelle, A. (2003) *N Engl J Med* 348, 919-32.
- [251] Akira, S. et al. (1994) *Cell* 77, 63-71.
- [252] Darnell, J.E., Kerr, I.M. and Stark, G.R. (1994) *Science (New York, N.Y.)* 264, 1415-1421.
- [253] Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A.L.C. and Cao, X. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 29252-29260.
- [254] Finbloom, D.S. and Larner, A.C. (1995) *Cellular Signalling* 7, 739-745.
- [255] Sotiropoulos, A., Moutoussamy, S., Renaudie, F., Clauss, M., Kayser, C., Gouilleux, F., Kelly, P.A. and Finidori, J. (1996) *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 10, 998-1009.
- [256] Brizzi, M.F., Aronica, M.G., Rosso, A., Bagnara, G.P., Yarden, Y. and Pegoraro, L. (1996) *The Journal of Biological Chemistry* 271, 3562-3567.
- [257] Yuan, Z.-L., Guan, Y.-J., Chatterjee, D. and Chin, Y.E. (2005) *Science (New York, N.Y.)* 307, 269-273 .
- [258] Wen, Z., Zhong, Z. and Darnell, J.E. (1995) *Cell* 82, 241-250 .
- [259] Zhao, H., Nakajima, R., Kunimoto, H., Sasaki, T., Kojima, H. and Nakajima, K. (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 541-548 .
- [260] Bhattacharya, S. and Schindler, C. (2003) *The Journal of Clinical Investigation* 111, 553-559 .
- [261] Chapman, R.S. et al. (1999) *Genes & Development* 13, 2604-2616.
- [262] Li, W., Liang, X., Kellendonk, C., Poli, V. and Taub, R. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 28411-28417.
- [263] Takeda, K., Clausen, B.E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Förster, I. and Akira, S. (1999) *Immunity* 10, 39-49.
- [264] Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3801-3804 .
- [265] Proietti, C. et al. (2005) *Molecular and Cellular Biology* 25, 4826-4840.
- [266] Zhong, Z., Wen, Z. and Darnell, J.E. (1994) *Science (New York, N.Y.)* 264, 95-98 .
- [267] Yu, C.L., Meyer, D.J., Campbell, G.S., Larner, A.C., Carter-Su, C., Schwartz, J. and Jove, R. (1995) *Science (New York, N.Y.)* 269, 81-83.
- [268] Giordano, V. et al. (1997) *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158, 4097-4103 .

- [269] Garcia, R. et al. (1997) *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 8, 1267-1276.
- [270] Lütticken, C. et al. (1994) *Science (New York, N.Y.)* 263, 89-92.
- [271] Megeney, L.A., Perry, R.L., LeCouter, J.E. and Rudnicki, M.A. (1996) *Developmental Genetics* 19, 139-145 .
- [272] Migone, T.S., Lin, J.X., Cereseto, A., Mulloy, J.C., O'Shea, J.J., Franchini, G. and Leonard, W.J. (1995) *Science (New York, N.Y.)* 269, 79-81.
- [273] Tian, S.S., Tapley, P., Sincich, C., Stein, R.B., Rosen, J. and Lamb, P. (1996) *Blood* 88, 4435-4444 .
- [274] Jain, N., Zhang, T., Kee, W.H., Li, W. and Cao, X. (1999) *The Journal of Biological Chemistry* 274, 24392-24400.
- [275] Takata, H. et al. (2007) *Current Biology: CB* 17, 1356-1361.
- [276] Fu, A.K.Y., Fu, W.-Y., Ng, A.K.Y., Chien, W.W.Y., Ng, Y.-P., Wang, J.H. and Ip, N.Y. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6728-6733.
- [277] Woetmann, A. et al. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10620-10625.
- [278] Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997) *Science (New York, N.Y.)* 278, 1803-1805 .
- [279] Lundquist, A., Barré, B., Bienvenu, F., Hermann, J., Avril, S. and Coqueret, O. (2003) *Blood* 101, 4070-4077 .
- [280] Coqueret, O. and Gascan, H. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* 275, 18794-18800.
- [281] Bienvenu, F., Gascan, H. and Coqueret, O. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 16840-16847.
- [282] Daino, H. et al. (2000) *Blood* 95, 2577-2585.
- [283] Darnowski, J.W., Goulette, F.A., Guan, Y.-j., Chatterjee, D., Yang, Z.-F., Cousens, L.P. and Chin, Y.E. (2006) *The Journal of Biological Chemistry* 281, 17707-17717 .
- [284] Ahn, K.S., Sethi, G., Sung, B., Goel, A., Ralhan, R. and Aggarwal, B.B. (2008) *Cancer Research* 68, 4406-4415 .
- [285] Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D.M. and Coqueret, O. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 8004-8011.
- [286] Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S. and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* 23, 7391-7398
- [287] Garriga, J. and Graña, X. (2004) *Gene* 337, 15-23.
- [288] Vigneron, A. (2006) in: *Biologie cellulaire et moléculaire*, Vol. Doctorat UNIVERSITE D'ANGERS, ANGERS.
- [289] Xiao, H., Chung, J., Kao, H.-Y. and Yang, Y.-C. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 11197-11204 .
- [290] Zhang, Q., Wang, H.Y., Woetmann, A., Raghunath, P.N., Odum, N. and Wasik, M.A. (2006) *Blood* 108, 1058-1064 .
- [291] Barré, B., Vigneron, A. and Coqueret, O. (2005) *The Journal of Biological Chemistry* 280, 15673-15681.
- [292] Vigneron, A., Cherier, J., Barré, B., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2006) *The Journal of Biological Chemistry* 281, 34742-34750 .
- [293] Barré, B., Avril, S. and Coqueret, O. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 2990-2996 .
- [294] Raz, R., Lee, C.K., Cannizzaro, L.A., d'Eustachio, P. and Levy, D.E. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2846-2851 .

- [295] Levy, D.E. and Lee, C.-k. (2002) *The Journal of Clinical Investigation* 109, 1143-1148.
- [296] Dalwadi, H. et al. (2005) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7674-7682.
- [297] Ernst, M. et al. (2008) *The Journal of Clinical Investigation* 118, 1727-1738 .
- [298] Huang, S. (2007) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, 1362-1366 .
- [299] Chiarle, R. et al. (2005) *Nature Medicine* 11, 623-629.
- [300] Coppo, P. et al. (2006) *British Journal of Haematology* 134, 171-179.
- [301] Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S. and Hiddemann, W. (2002) *Experimental Hematology* 30, 262-271.
- [302] Bromberg, J. (2002) *The Journal of Clinical Investigation* 109, 1139-1142.
- [303] Chan, K.S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J. and DiGiovanni, J. (2004) *The Journal of Clinical Investigation* 114, 720-728.
- [304] Jenkins, B.J. et al. (2005) *Nature Medicine* 11, 845-852 .
- [305] Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. and Darnell, J.E. (1999) *Cell* 98, 295-303.
- [306] Klebig, C., Seitz, S., Arnold, W., Deutschmann, N., Pacyna-Gengelbach, M., Scherneck, S. and Petersen, I. (2005) *Cancer Research* 65, 394-400 .
- [307] Bromberg, J.F., Horvath, C.M., Besser, D., Lathem, W.W. and Darnell, J.E. (1998) *Molecular and Cellular Biology* 18, 2553-2558 .
- [308] Leslie, K. et al. (2006) *Cancer Research* 66, 2544-2552.
- [309] Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J. and Jove, R. (2000) *Oncogene* 19, 5419-5427.
- [310] Vigneron, A., Roninson, I.B., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2005) *Cancer Research* 65, 8927-8935 .
- [311] Maa, M.C., Leu, T.H., McCarley, D.J., Schatzman, R.C. and Parsons, S.J. (1995) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6981-6985 .
- [312] Yeatman, T.J. (2004) *Nature Reviews. Cancer* 4, 470-480 .
- [313] Bromann, P.A., Korkaya, H. and Courtneidge, S.A. (2004) *Oncogene* 23, 7957-7968.
- [314] Ren, Z. and Schaefer, T.S. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 38486-38493.
- [315] Untawale, S. et al. (1993) *Cancer Research* 53, 1630-1636 .
- [316] Quadros, M.R.D., Peruzzi, F., Kari, C. and Rodeck, U. (2004) *Cancer Research* 64, 3934-3939.
- [317] Choi, S.H., Mendrola, J.M. and Lemmon, M.A. (2007) *Oncogene* 26, 1567-1576 .
- [318] Alvarez, J.V., Greulich, H., Sellers, W.R., Meyerson, M. and Frank, D.A. (2006) *Cancer Research* 66, 3162-3168 .
- [319] Park, S., Kim, D., Kaneko, S., Szewczyk, K.M., Nicosia, S.V., Yu, H., Jove, R. and Cheng, J.Q. (2005) *J Biol Chem* 280, 38932-41.
- [320] Yu, H., Kortylewski, M. and Pardoll, D. (2007) *Nature Reviews. Immunology* 7, 41-51 .
- [321] Konnikova, L., Simeone, M.C., Kruger, M.M., Kotecki, M. and Cochran, B.H. (2005) *Cancer Research* 65, 6516-6520 .
- [322] Yamamoto, H., Ngan, C.Y. and Monden, M. (2008) *Cancer Science* 99, 1709-1714 .
- [323] Vigneron, A., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2008) *Cancer Research* 68, 815-825 .
- [324] Wegrzyn, J. et al. (2009) *Science (New York, N.Y.)* 323, 793-797 .
- [325] Gough, D.J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A.C. and Levy, D.E. (2009) *Science (New York, N.Y.)* 324, 1713-1716 .

- [326] Lu, S. et al. (2008) *Endocrinology* 149, 4809-4820.
- [327] Dechow, T.N., Pedranzini, L., Leitch, A., Leslie, K., Gerald, W.L., Linkov, I. and Bromberg, J.F. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10602-10607.
- [328] Fitzgerald, J.S. et al. (2005) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 2284-2296.
- [329] Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G. and Giancotti, F.G. (2006) *Cell* 126, 489-502.
- [330] Dauer, D.J. et al. (2005) *Oncogene* 24, 3397-3408.
- [331] Henderson, J. et al. (2005) *Human Genetics* 118, 416-423.
- [332] Niu, G. et al. (2002) *Oncogene* 21, 2000-2008.
- [333] Terui, K. et al. (2004) *Journal of Hepatology* 41, 957-965.
- [334] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) *Nature* 454, 436-444 .
- [335] Karin, M. and Greten, F.R. (2005) *Nature Reviews. Immunology* 5, 749-759 .
- [336] Pikarsky, E. et al. (2004) *Nature* 431, 461-466.
- [337] Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R. (2009) *Nature Reviews. Cancer* 9, 798-809 .
- [338] Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J. and Schreiber, R.D. (2007) *Nature* 450, 903-907.
- [339] Kortylewski, M. et al. (2009) *Cancer Cell* 15, 114-123.
- [340] Russo Vincenzo E.A., M.R.A., Riggs Arthur D. (1996) in: *Science* (New York, N.Y.) (Series, C.S.H.M., Ed.) Cold Spring Harbor laboratory press, USA.
- [341] Darnell, J.E. (2002) *Nature Reviews. Cancer* 2, 740-749.
- [342] Kortylewski, M. et al. (2005) *Nature Medicine* 11, 1314-1321.
- [343] Turkson, J. et al. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 45443-45455 .
- [344] Turkson, J. et al. (2004) *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 1533-1542.
- [345] Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T.U. and Berg, T. (2006) *Chemistry & Biology* 13, 1235-1242.
- [346] Leong, P.L. et al. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4138-4143.
- [347] Ling, X. and Arlinghaus, R.B. (2005) *Cancer Research* 65, 2532-2536.
- [348] Kortylewski, M. et al. (2009) *Nature Biotechnology* 27, 925-932.
- [349] Bhutani, M., Pathak, A.K., Nair, A.S., Kunnumakkara, A.B., Guha, S., Sethi, G. and Aggarwal, B.B. (2007) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, 3024-3032.
- [350] Selvendiran, K. et al. (2006) *Cancer Research* 66, 4826-4834.
- [351] Bharti, A.C. et al. (2004) *Blood* 103, 3175-3184.
- [352] Real, P.J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J.C., Lopez-Vega, J.M. and Fernandez-Luna, J.L. (2002) *Oncogene* 21, 7611-7618.
- [353] Otero, D.C., Poli, V., David, M. and Rickert, R.C. (2006) *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 177, 6593-6597.
- [354] Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S.M. and Gabrilovich, D.I. (2005) *Cancer Research* 65, 9525-9535.
- [355] Gozgit, J.M. et al. (2008) *The Journal of Biological Chemistry* 283, 32334-32343 .
- [356] Ko, J.S. et al. (2009) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 15, 2148-2157.
- [357] Ozao-Choy, J. et al. (2009) *Cancer Research* 69, 2514-2522 .
- [358] Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R. and Yu, H. (2009) *Cancer Research* 69, 2506-2513.
- [359] Bagheri-Yarmand, R., Vadlamudi, R.K. and Kumar, R. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 17421-17429.

- [360] Milani, M., Rzymiski, T., Mellor, H.R., Pike, L., Bottini, A., Generali, D. and Harris, A.L. (2009) *Cancer Research* 69, 4415-4423.
- [361] Ameri, K. and Harris, A.L. (2008) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 14-21.
- [362] Rzymiski, T., Milani, M., Singleton, D.C. and Harris, A.L. (2009) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 3838-3847.
- [363] Itoh, T., O'Shea, C. and Linn, S. (2003) *Molecular and Cellular Biology* 23, 7540-7553.
- [364] Stoyanova, T., Yoon, T., Kopanja, D., Mokyr, M.B. and Raychaudhuri, P. (2008) *Molecular and Cellular Biology* 28, 177-187.
- [365] Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E. and Becuwe, P. (2009) *The Journal of Biological Chemistry* 284, 14165-14176.
- [366] Kim, N.K. et al. (2003) *Anticancer Research* 23, 1417-1423.
- [367] Rinne, M., Caldwell, D. and Kelley, M.R. (2004) *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 955-967.
- [368] Jüttner, S. et al. (2003) *Cellular Microbiology* 5, 821-834.
- [369] Bu, Y. and Gelman, I.H. (2007) *The Journal of Biological Chemistry* 282, 26725-26739.
- [370] Jaiswal, A.S. and Narayan, S. (2001) *Journal of Cellular Biochemistry* 81, 262-277 .
- [371] Lim, L.H.K. and Pervaiz, S. (2007) *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 968-975.
- [372] Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M. and Daly, R.J. (2009) *The Biochemical Journal* 418, 475-489.
- [373] Takagaki, K., Satoh, T., Tanuma, N., Masuda, K., Takekawa, M., Shima, H. and Kikuchi, K. (2004) *The Biochemical Journal* 383, 447-455.
- [374] Kim, J., Namkung, W., Yoon, J.S., Jo, M.J., Lee, S.H., Kim, K.H., Kim, J.Y. and Lee, M.G. (2009) *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 89, 867-874.
- [375] Choi, W.-I. et al. (2009) *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 23, 359-370 .
- [376] Lamberti, A. et al. (2007) *Cell Death and Differentiation* 14, 952-962.
- [377] Byun, H.-O. et al. (2009) *Cancer Research* 69, 4638-4647.
- [378] Kobayashi, Y. and Yonehara, S. (2009) *Cell Death and Differentiation* 16, 139-150 .
- [379] Kim, J.K. et al. (2003) *Anticancer Research* 23, 4709-4713.
- [380] Kim, J.K., Ryll, R., Ishizuka, Y. and Kato, S. (2000) *Gene* 257, 327-334.
- [381] Ryoo, Z.Y. et al. (2006) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, 995-1002.
- [382] Kim, S.J. et al. (2008) *Anticancer Research* 28, 865-871.
- [383] Nakahara, S., Oka, N. and Raz, A. (2005) *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 10, 267-275.
- [384] Nakahara, S. and Raz, A. (2007) *Cancer Metastasis Reviews* 26, 605-610.
- [385] Pan, Z.-Q., Kentsis, A., Dias, D.C., Yamoah, K. and Wu, K. (2004) *Oncogene* 23, 1985-1997.
- [386] Sansal, I., Dupont, E., Toru, D., Evrard, C. and Rouget, P. (2000) *Oncogene* 19, 5000-5009.
- [387] Spencer, M.L., Theodosiou, M. and Noonan, D.J. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 37069-37078.
- [388] Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H. and Moustakas, A. (2001) *Molecular Biology of the Cell* 12, 1079-1091.

- [389] Wurzer, G., Mosgoeller, W., Chabicovsky, M., Cerni, C. and Wesierska-Gadek, J. (2001) *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* Suppl 36, 1-11.
- [390] Syed, V., Zhang, X., Lau, K.-M., Cheng, R., Mukherjee, K. and Ho, S.-M. (2005) *Oncogene* 24, 8128-8143.
- [391] Króliczak, W., Pietrzak, M. and Puzianowska-Kuznicka, M. (2008) *Acta Biochimica Polonica* 55, 559-570.
- [392] Słomnicki, Ł.P., Nawrot, B. and Leśniak, W. (2009) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 784-790.
- [393] Leśniak, W., Słomnicki, Ł.P. and Filipek, A. (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390, 1087-1092.
- [394] Mirza, S., Sharma, G., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S.D. and Ralhan, R. (2009) *Clinical Biochemistry*.
- [395] Umbricht, C.B., Evron, E., Gabrielson, E., Ferguson, A., Marks, J. and Sukumar, S. (2001) *Oncogene* 20, 3348-3353.
- [396] Dellambra, E. et al. (1995) *Journal of Cell Science* 108 ( Pt 11), 3569-3579.
- [397] Fomenkov, A. et al. (2004) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3, 1285-1295.
- [398] Euer, N., Schwirzke, M., Evtimova, V., Burtscher, H., Jarsch, M., Tarin, D. and Weidle, U.H. (2002) *Anticancer Research* 22, 733-740.
- [399] Diamandis, E.P., Yousef, G.M., Soosaipillai, A.R. and Bunting, P. (2000) *Clinical Biochemistry* 33, 579-583.
- [400] Rückert, F. et al. (2008) *British Journal of Cancer* 99, 1484-1492.
- [401] White, N.M.A., Mathews, M., Yousef, G.M., Prizada, A., Popadiuk, C. and Doré, J.J.E. (2009) *British Journal of Cancer* 101, 1107-1113.
- [402] Yoon, S.Y. et al. (2006) *International Journal of Oncology* 29, 315-327.
- [403] Madhunapantula, S.V., Sharma, A. and Robertson, G.P. (2007) *Cancer Research* 67, 3626-3636.
- [404] Wang, L., Harris, T.E. and Lawrence, J.C. (2008) *The Journal of Biological Chemistry* 283, 15619-15627.
- [405] Thedieck, K., Polak, P., Kim, M.L., Molle, K.D., Cohen, A., Jenö, P., Arriemerlou, C. and Hall, M.N. (2007) *PloS One* 2, e1217.
- [406] Huang, B. and Porter, G. (2005) *Acta Pharmacologica Sinica* 26, 1253-1258 .
- [407] Patel, M., Lu, L., Zander, D.S., Sreerama, L., Coco, D. and Moreb, J.S. (2008) *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 59, 340-349.
- [408] Sládek, N.E., Kollander, R., Sreerama, L. and Kiang, D.T. (2002) *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49, 309-321.
- [409] Dunys, J., Kawarai, T., Sevalle, J., Dolcini, V., George-Hyslop, P.S., Da Costa, C.A. and Checler, F. (2007) *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10516-10525 .
- [410] Laudon,.
- [411] Ou, Y.-H., Chung, P.-H., Hsu, F.-F., Sun, T.-P., Chang, W.-Y. and Shieh, S.-Y. (2007) *The EMBO Journal* 26, 3968-3980 .
- [412] Majid, S. et al. (2009) *Carcinogenesis* 30, 662-670.
- [413] Yu, J., Zhang, Y., Qi, Z., Kurtycz, D., Vacano, G. and Patterson, D. (2008) *Gene Expression* 14, 173-182.
- [414] Sagulenko, V., Muth, D., Sagulenko, E., Paffhausen, T., Schwab, M. and Westermann, F. (2008) *Carcinogenesis* 29, 1869-1877.
- [415] Mariani, E. et al. (2006) *Journal of the Neurological Sciences* 247, 187-191 .
- [416] Rochefort, H., Garcia, M., Glondu, M., Laurent, V., Liaudet, E., Rey, J.M. and Roger, P. (2000) *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 291, 157-170 .
- [417] Poulton, J. et al. (2009) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1792, 1109-1112.

- [418] Chen, R.W., Saunders, P.A., Wei, H., Li, Z., Seth, P. and Chuang, D.M. (1999) *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 9654-9662.
- [419] Chuang, D.M. and Ishitani, R. (1996) *Nature Medicine* 2, 609-610 .
- [420] Tarze, A. et al. (2007) *Oncogene* 26, 2606-2620 .
- [421] Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X. and Kufe, D. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 39609-39614.
- [422] Gouaze, V., Andrieu-Abadie, N., Cuvillier, O., Malagarie-Cazenave, S., Frisach, M.-F., Mirault, M.-E. and Levade, T. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 42867-42874.
- [423] Gouazé, V., Mirault, M.E., Carpentier, S., Salvayre, R., Levade, T. and Andrieu-Abadie, N. (2001) *Molecular Pharmacology* 60, 488-496.
- [424] Hansen, R.D. et al. (2009) *Mutation Research* 664, 13-19.
- [425] Hu, Y., Benya, R.V., Carroll, R.E. and Diamond, A.M. (2005) *The Journal of Nutrition* 135, 3021S-3024S.
- [426] Lei, X.G., Cheng, W.-H. and McClung, J.P. (2007) *Annual Review of Nutrition* 27, 41-61.
- [427] Davidson, B., Alejandro, E., Flørenes, V.A., Goderstad, J.-M., Risberg, B., Kristensen, G.B., Trope, C.G. and Kohn, E.C. (2004) *Cancer* 100, 2139-2147.
- [428] Monami, G. et al. (2009) *The American Journal of Pathology* 174, 1037-1047 .
- [429] Monami, G., Gonzalez, E.M., Hellman, M., Gomella, L.G., Baffa, R., Iozzo, R.V. and Morrione, A. (2006) *Cancer Research* 66, 7103-7110
- [430] Pizarro, G.O., Zhou, X.C., Koch, A., Gharib, M., Raval, S., Bible, K. and Jones, M.B. (2007) *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 120, 2339-2343.
- [431] Holley, S.L., Fryer, A.A., Haycock, J.W., Grubb, S.E.W., Strange, R.C. and Hoban, P.R. (2007) *Carcinogenesis* 28, 2268-2273.
- [432] Lo, H.-W., Stephenson, L., Cao, X., Milas, M., Pollock, R. and Ali-Osman, F. (2008) *Molecular Cancer Research: MCR* 6, 843-850.
- [433] Meiers, I., Shanks, J.H. and Bostwick, D.G. (2007) *Pathology* 39, 299-304.
- [434] Lamarca, V., Marzo, I., Sanz-Clemente, A. and Carrodeguas, J.A. (2008) *European Journal of Cell Biology* 87, 325-334.
- [435] Xu, X. et al. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 48913-48922 .
- [436] Bauer, K. et al. (2009) *Oncogene* 28, 2784-2795.
- [437] Muramatsu, T. and Miyauchi, T. (2003) *Histology and Histopathology* 18, 981-987 .
- [438] Zheng, J., Koblinski, J.E., Dutson, L.V., Feeney, Y.B. and Clevenger, C.V. (2008) *Cancer Research* 68, 7769-7778.
- [439] Immenschuh, S. and Baumgart-Vogt, E. (2005) *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 768-777.
- [440] Neumann, C.A. and Fang, Q. (2007) *Current Opinion in Pharmacology* 7, 375-380 .
- [441] Choi, H.Y., Chong, S.A. and Nam, M.J. (2009) *Cancer Genomics & Proteomics* 6, 263-268.
- [442] Han, Y.-H., Kim, H.-S., Kim, J.-M., Kim, S.-K., Yu, D.-Y. and Moon, E.-Y. (2005) *FEBS Letters* 579, 4897-4902.
- [443] Huang, Y., Jin, Y., Yan, C.-H., Yu, Y., Bai, J., Chen, F., Zhao, Y.-Z. and Fu, S.-B. (2008) *Molecular and Cellular Biochemistry* 309, 117-123.
- [444] Zhang, Y., Feurino, L.W., Zhai, Q., Wang, H., Fisher, W.E., Chen, C., Yao, Q. and Li, M. (2008) *Cancer Biology & Therapy* 7, 419-423.
- [445] Moon, E.-Y., Song, J.-H. and Yang, K.-H. (2007) *Oncology Research* 16, 507-516 .

- [446] Baughman, J.M., Nilsson, R., Gohil, V.M., Arlow, D.H., Gauhar, Z. and Mootha, V.K. (2009) *PLoS Genetics* 5, e1000590.
- [447] Seo, M., Lee, W.-H. and Suk, K. (2009) *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- [448] Bühler, H. and Schaller, G. (2005) *Molecular Cancer Research: MCR* 3, 365-371 .
- [449] Pankov, R., Umezawa, A., Maki, R., Der, C.J., Hauser, C.A. and Oshima, R.G. (1994) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 873-877.
- [450] Caulín, C., Salvesen, G.S. and Oshima, R.G. (1997) *The Journal of Cell Biology* 138, 1379-1394.
- [451] Fujita, J., Dobashi, N., Ohtsuki, Y., Ueda, Y., Bandoh, S., Yamadori, I. and Takahara, J. (1999) *British Journal of Cancer* 81, 769-773.
- [452] Tojo, Y. et al. (2003) *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 42, 153-161.
- [453] Liu, F., Fan, D., Qi, J., Zhu, H., Zhou, Y., Yang, C., Zhu, Z. and Xiong, D. (2008) *Life Sciences* 83, 496-501.
- [454] Nakamura, K., Kimple, A.J., Siderovski, D.P. and Johnson, G.L. (2009) *The Journal of Biological Chemistry*.
- [455] Seibenhener, M.L., Geetha, T. and Wooten, M.W. (2007) *FEBS Letters* 581, 175-179 .
- [456] Kim, J.Y. and Ozato, K. (2009) *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, 2131-2140.
- [457] Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C. and Menendez, J.A. (2009) *PloS One* 4, e6251 .
- [458] Dang, C., Gottschling, M., Manning, K., O'Currain, E., Schneider, S., Sterry, W., Stockfleth, E. and Nindl, I. (2006) *Oncology Reports* 16, 513-519 .
- [459] De Angelis, P.M., Svendsrud, D.H., Kravik, K.L. and Stokke, T. (2006) *Molecular Cancer* 5, 20.
- [460] Johansson, K., Ahlen, K., Rinaldi, R., Sahlander, K., Siritantikorn, A. and Morgenstern, R. (2007) *Carcinogenesis* 28, 465-470.
- [461] Lee, K.K., Shimoji, M., Hossain, Q.S., Sunakawa, H. and Aniya, Y. (2008) *Toxicology and Applied Pharmacology* 232, 109-118.
- [462] Quinn, M.C.J., Filali-Mouhim, A., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.-M. and Tonin, P.N. (2009) *Molecular Carcinogenesis* 48, 648-661.
- [463] Cai, X. et al. (2009) *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 65, 299-305.
- [464] Cascón, A. et al. (2007) *Human Mutation* 28, 613-621.
- [465] Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. and Torti, F.M. (2001) *The Biochemical Journal* 357, 241-247.
- [466] Yang, W.S. and Stockwell, B.R. (2008) *Chemistry & Biology* 15, 234-245.
- [467] Ricolleau, G. et al. (2006) *Proteomics* 6, 1963-1975.
- [468] Romanuik, T.L., Ueda, T., Le, N., Haile, S., Yong, T.M.K., Thomson, T., Vessella, R.L. and Sadar, M.D. (2009) *The American Journal of Pathology* 175, 2264-2276 .
- [469] Yanagawa, T., Watanabe, H., Takeuchi, T., Fujimoto, S., Kurihara, H. and Takagishi, K. (2004) *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 84, 513-522.
- [470] Kastl, L., Brown, I. and Schofield, A.C. (2009) *Molecular and Cellular Probes*.
- [471] Caprini, E. et al. (2009) *Cancer Research* 69, 8438-8446.
- [472] Barnard, G.F. et al. (1995) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1272, 147-153.
- [473] Kanayama, H. et al. (1991) *Cancer Research* 51, 6677-6685.
- [474] Kubota, T., Yokosawa, N., Yokota, S.-i. and Fujii, N. (2002) *Journal of Virology* 76, 12676-12682.

- [475] Usacheva, A., Smith, R., Minshall, R., Baida, G., Seng, S., Croze, E. and Colamonici, O. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 22948-22953.
- [476] Rucci, N. et al. (2009) *The Journal of Cell Biology* 187, 669-683 .
- [477] Vermeulen, S.J. et al. (1999) *Oncogene* 18, 905-915.
- [478] Ye, Y. et al. (2009) *Cancer Research* 69, 8482-8490.
- [479] Deeley, R.G., Westlake, C. and Cole, S.P.C. (2006) *Physiological Reviews* 86, 849-899 .
- [480] Yasui, K. et al. (2004) *Cancer Research* 64, 1403-1410.
- [481] Hour, T.-C. et al. (2009) *The International Journal of Biological Markers* 24, 171-178.
- [482] Ouellet, V. et al. (2005) *Oncogene* 24, 4672-4687.
- [483] Tummala, R., Wolle, D., Barwe, S.P., Sampson, V.B., Rajasekaran, A.K. and Pendyala, L. (2009) *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64, 1187-1194 .
- [484] Yancy, H.F., Mason, J.A., Peters, S., Thompson, C.E., Littleton, G.K., Jett, M. and Day, A.A. (2007) *Journal of Carcinogenesis* 6, 8.
- [485] McNamara, R.K. and Lenox, R.H. (1998) *The Journal of Comparative Neurology* 397, 337-356.
- [486] Ramsden, J.J. (2000) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32, 475-479.
- [487] van den Bout, I., van Rheenen, J., van Angelen, A.A., de Rooij, J., Wilhelmsen, K., Jalink, K., Divecha, N. and Sonnenberg, A. (2008) *Experimental Cell Research* 314, 330-341.
- [488] Wright, P.K., May, F.E., Darby, S., Saif, R., Lennard, T.W. and Westley, B.R. (2009) *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2, 463-475.
- [489] Sokol, J.P. and Schiemann, W.P. (2004) *Molecular Cancer Research: MCR* 2, 183-195
- [490] Wegiel, B., Jiborn, T., Abrahamson, M., Helczynski, L., Otterbein, L., Persson, J.L. and Bjartell, A. (2009) *PloS One* 4, e7953 .
- [491] Diehl, C., Lipozencić, J. and Ledić-Drvar, D. (2009) *Acta Dermatovenerologica Croatica: ADC / Hrvatsko Dermatolosko Drustvo* 17, 25-39.
- [492] Teoh, M.L.T., Fitzgerald, M.P., Oberley, L.W. and Domann, F.E. (2009) *Cancer Research* 69, 6355-6363.
- [493] Cheuk, A.T.C., Mufti, G.J. and Guinn, B.-a. (2004) *Cancer Gene Therapy* 11, 215-226
- [494] Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (2002) *International Immunology* 14, 275-286.
- [495] Kim, H.H., Kwack, K. and Lee, Z.H. (2000) *Molecules and Cells* 10, 247-252 .
- [496] Shin, S.M., Kim, Y.H., Choi, B.K., Kwon, P.M., Lee, H.-W. and Kwon, B.S. (2007) *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1455-1465.
- [497] Yang, J., Park, O.J., Lee, Y.J., Jung, H.-M., Woo, K.M. and Choi, Y. (2008) *European Journal of Immunology* 38, 1598-1609.
- [498] Zimmerman, B., Simaan, M., Lee, M.-H., Luttrell, L.M. and Laporte, S.A. (2009) *Cellular Signalling* 21, 103-110.
- [499] Cheng, Q., Lau, W.M., Tay, S.K., Chew, S.H., Ho, T.H. and Hui, K.M. (2002) *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 98, 419-426.
- [500] Kobayashi, T. et al. (2006) *International Journal of Molecular Medicine* 18, 161-170 .
- [501] Wang, M., Hu, Y. and Stearns, M.E. (2009) *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 28, 6.
- [502] Liu, J.-J., Huang, B.H., Zhang, J., Carson, D.D. and Hooi, S.C. (2006) *Journal of Cellular Physiology* 207, 287-292.
- [503] Sen, N. et al. (2008) *Nature Cell Biology* 10, 866-873.
- [504] Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C. and Cartwright, C.A. (2004) *Molecular and Cellular Biology* 24, 6788-6798.

- [505] Kim, J.-H., Yoon, M.-S. and Chen, J. (2009) *The Journal of Biological Chemistry*.
- [506] Busch, S., Renaud, S.J., Schleussner, E., Graham, C.H. and Markert, U.R. (2009) *Experimental Cell Research* 315, 1724-1733.
- [507] Guéhenneux, F. et al. (1997) *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 11, 370-375.
- [508] Ishiguchi, H., Izumi, H., Torigoe, T., Yoshida, Y., Kubota, H., Tsuji, S. and Kohno, K. (2004) *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 111, 900-909.
- [509] Igarashi, T. et al. (2007) *Oncogene* 26, 4749-4760.
- [510] Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Raychaudhuri, P. and Bagchi, S. (2009) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8.
- [511] Gao, Q., Hua, J., Kimura, R., Headd, J.J., Fu, X.-Y. and Chin, Y.E. (2004) *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 3, 704-714.
- [512] Williams, J.G. and Zvelebil, M. (2004) *Trends in Plant Science* 9, 161-163.
- [513] Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J. and Crespo, J.L. (2008) *Autophagy* 4, 851-865.
- [514] Koga, A., Ishibashi, T., Kimura, S., Uchiyama, Y. and Sakaguchi, K. (2006) *Plant Molecular Biology* 61, 227-240.
- [515] Molinier, J., Lechner, E., Dumbliauskas, E. and Genschik, P. (2008) *PLoS Genetics* 4, e1000093.
- [516] el-Deiry, W.S. et al. (1993) *Cell* 75, 817-825.
- [517] Mungall, A.J. et al. (2003) *Nature* 425, 805-811.
- [518] Dotto, G.P. (2000) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1471, M43-56.
- [519] Okuyama, R., LeFort, K. and Dotto, G.P. (2004) *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 9, 248-252.
- [520] Chen, X., Chi, Y., Bloecher, A., Aebersold, R., Clurman, B.E. and Roberts, J.M. (2004) *Molecular Cell* 16, 839-847.
- [521] Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A. and Lamb, N.J.C. (2006) *Molecular and Cellular Biology* 26, 8267-8280 .
- [522] Baross, A., Schertzer, M., Zuyderduyn, S.D., Jones, S.J.M., Marra, M.A. and Lansdorp, P.M. (2004) *Genes, Chromosomes & Cancer* 39, 298-310.
- [523] Morgan, D.O. (1995) *Nature* 374, 131-134.
- [524] Choudhury, A.R. et al. (2007) *Nature Genetics* 39, 99-105 .
- [525] Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) *Cell* 75, 805-816.
- [526] Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1994) *Experimental Cell Research* 211, 90-98.
- [527] Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* 6, 847-852 .
- [528] Gerhard, D.S. et al. (2004) *Genome Research* 14, 2121-2127.
- [529] Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993) *Nature* 366, 707-.
- [530] Harper, J.W. et al. (1995) *Molecular Biology of the Cell* 6, 387-400.
- [531] Adkins, J.N. and Lumb, K.J. (2000) *Biochemistry* 39, 13925-13930.
- [532] Hengst, L., Göpfert, U., Lashuel, H.A. and Reed, S.I. (1998) *Genes & Development* 12, 3882-3888 .
- [533] Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D. and Dutta, A. (1996) *Molecular and Cellular Biology* 16, 4673-4682.
- [534] Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M. and Kaelin, W.G. (1996) *Molecular and Cellular Biology* 16, 6623-6633.
- [535] Zhang, H., Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) *Genes & Development* 8, 1750-1758 .

- [536] Besson, A., Dowdy, S.F. and Roberts, J.M. (2008) *Developmental Cell* 14, 159-169.
- [537] Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. (1995) *Nature* 377, 552-557.
- [538] Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) *Cell* 82, 675-684
- [539] Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A. and Xiong, Y. (1994) *Oncogene* 9, 2261-2268 .
- [540] Martín, A., Odajima, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005) *Cancer Cell* 7, 591-598.
- [541] Rowland, B.D. and Peeper, D.S. (2006) *Nat Rev Cancer* 6, 11-23.
- [542] Dulić, V., Stein, G.H., Far, D.F. and Reed, S.I. (1998) *Molecular and Cellular Biology* 18, 546-557.
- [543] Bunz, F. et al. (1998) *Science (New York, N.Y.)* 282, 1497-1501.
- [544] Dash, B.C. and El-Deiry, W.S. (2005) *Molecular and Cellular Biology* 25, 3364-3387.
- [545] Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Mäkela, T.P. and Medema, R.H. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* 275, 30638-30643.
- [546] Mandal, M., Bandyopadhyay, D., Goepfert, T.M. and Kumar, R. (1998) *Oncogene* 16, 217-225 .
- [547] Rössig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2001) *Molecular and Cellular Biology* 21, 5644-5657.
- [548] Fairman, M.P. (1990) *Journal of Cell Science* 95 ( Pt 1), 1-4.
- [549] Moldovan, G.-L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007) *Cell* 129, 665-679.
- [550] Cayrol, C. and Ducommun, B. (1998) *Oncogene* 17, 2437-2444.
- [551] Cayrol, C., Knibiehler, M. and Ducommun, B. (1998) *Oncogene* 16, 311-320 .
- [552] Tom, S., Henriksen, L.A., Park, M.S. and Bambara, R.A. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 24817-24825.
- [553] Tom, S., Ranalli, T.A., Podust, V.N. and Bambara, R.A. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 48781-48789.
- [554] Umar, A., Buermeier, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M. and Kunkel, T.A. (1996) *Cell* 87, 65-73.
- [555] Cooper, M.P., Balajee, A.S. and Bohr, V.A. (1999) *Molecular Biology of the Cell* 10, 2119-29.
- [556] Fotedar, R., Bendjennat, M. and Fotedar, A. (2004) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3, 134-137.
- [557] Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997) *Science (New York, N.Y.)* 277, 1996-2000.
- [558] Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. (1994) *Nature* 369, 574-578 .
- [559] Coqueret, O. (2003) *Trends in Cell Biology* 13, 65-70.
- [560] Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G. and Sabbah, M. (2005) *Molecular and Cellular Biology* 25, 2419-2430.
- [561] Perkins, N.D. (2002) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 1, 39-41.
- [562] Ma, Y.Y. et al. (2000) *Oncogene* 19, 2739-2744.
- [563] Roninson, I.B. (2002) *Cancer Letters* 179, 1-14.
- [564] LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A. and Harlow, E. (1997) *Genes & Development* 11, 847-862.
- [565] Dupont, J., Karas, M. and LeRoith, D. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 37256-37264.
- [566] Zhang, C., Kavurma, M.M., Lai, A. and Khachigian, L.M. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 27903-27909.
- [567] Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. and Hung, M.C. (2001) *Nature Cell Biology* 3, 245-252.

- [568] Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S. (1999) *The EMBO Journal* 18, 1223-1234.
- [569] Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T. and Miura, M. (1998) *Oncogene* 17, 931-939.
- [570] Nishioka, C., Ikezoe, T., Yang, J., Komatsu, N., Koeffler, H.P. and Yokoyama, A. (2009) *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 125, 1168-1176.
- [571] el-Deiry, W.S. et al. (1995) *Cancer Research* 55, 2910-2919.
- [572] Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995) *Genes & Development* 9, 935-944.
- [573] Lanni, J.S. and Jacks, T. (1998) *Molecular and Cellular Biology* 18, 1055-1064 .
- [574] Cayrol, C. and Flemington, E.K. (1996) *The EMBO Journal* 15, 2748-2759.
- [575] Bacus, S.S. et al. (1996) *Oncogene* 12, 2535-2547.
- [576] Olson, M.F., Paterson, H.F. and Marshall, C.J. (1998) *Nature* 394, 295-299.
- [577] Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E. and McMahon, M. (1997) *Molecular and Cellular Biology* 17, 5598-5611.
- [578] Mukherjee, S. and Conrad, S.E. (2005) *The Journal of Biological Chemistry* 280, 17617-17625.
- [579] Jung, P., Menssen, A., Mayr, D. and Hermeking, H. (2008) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15046-15051
- [580] Jascur, T., Brickner, H., Salles-Passador, I., Barbier, V., El Khissiin, A., Smith, B., Fotedar, R. and Fotedar, A. (2005) *Molecular Cell* 17, 237-249.
- [581] Touitou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J. and Allday, M.J. (2001) *The EMBO Journal* 20, 2367-2375.
- [582] Beck, S.E., Jung, B.H., Del Rosario, E., Gomez, J. and Carethers, J.M. (2007) *Cellular Signalling* 19, 1465-1472.
- [583] Gong, J., Ammanamanchi, S., Ko, T.C. and Brattain, M.G. (2003) *Cancer Research* 63, 3340-3346 .
- [584] Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M. and Hershko, A. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 25752-25757.
- [585] Winters, Z.E., Leek, R.D., Bradburn, M.J., Norbury, C.J. and Harris, A.L. (2003) *Breast Cancer Research: BCR* 5, R242-249.
- [586] Rössig, L., Badorff, C., Holzmann, Y., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 9684-9689.
- [587] Li, Y., Dowbenko, D. and Lasky, L.A. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 11352-11361.
- [588] Oh, Y.-T., Chun, K.H., Park, B.D., Choi, J.-S. and Lee, S.K. (2007) *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12, 1339-1347.
- [589] Martín-Caballero, J., Flores, J.M., García-Palencia, P. and Serrano, M. (2001) *Cancer Research* 61, 6234-6238.
- [590] Franklin, D.S., Godfrey, V.L., O'Brien, D.A., Deng, C. and Xiong, Y. (2000) *Molecular and Cellular Biology* 20, 6147-6158.
- [591] Yang, W.C., Mathew, J., Velcich, A., Edlmann, W., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K. and Augenlicht, L.H. (2001) *Cancer Research* 61, 565-569.
- [592] Siegel, P.M. and Massagué, J. (2003) *Nature Reviews. Cancer* 3, 807-821.
- [593] McKenzie, K.E., Siva, A., Maier, S., Runnebaum, I.B., Seshadri, R. and Sukumar, S. (1997) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3, 1669-1673.
- [594] Shiohara, M. et al. (1994) *Blood* 84, 3781-3784.

- [595] Efeyan, A., Collado, M., Velasco-Miguel, S. and Serrano, M. (2007) *Oncogene* 26, 1645-1649.
- [596] Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G.J., Ogawa, A., Dorfman, I., Loda, M. and Fuchs, C.S. (2006) *The Journal of Pathology* 210, 147-154.
- [597] Viale, A. et al. (2009) *Nature* 457, 51-56.
- [598] Forster, K., Obermeier, A., Mitina, O., Simon, N., Warmuth, M., Krause, G. and Hallek, M. (2008) *Annals of Hematology* 87, 183-193 .
- [599] Carbone, C.J., Graña, X., Reddy, E.P. and Haines, D.S. (2007) *Cancer Research* 67, 4130-4137.
- [600] Carnero, A. and Beach, D.H. (2004) *Oncogene* 23, 6006-6011.
- [601] Liu, S., Bishop, W.R. and Liu, M. (2003) *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 6, 183-195.
- [602] Jackson, R.J., Adnane, J., Coppola, D., Cantor, A., Sebti, S.M. and Pledger, W.J. (2002) *Oncogene* 21, 8486-8497.
- [603] Yang, W. et al. (2001) *Cancer Research* 61, 6297-6302.
- [604] Di Gennaro, E. et al. (2003) *Journal of Cellular Physiology* 195, 139-150.
- [605] Yao, K.C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S. and Germano, I.M. (2003) *Journal of Neurosurgery* 98, 378-384.
- [606] Suzui, M., Masuda, M., Lim, J.T.E., Albanese, C., Pestell, R.G. and Weinstein, I.B. (2002) *Cancer Research* 62, 3997-4006.
- [607] Toyoshima, T., Kamijo, R., Takizawa, K., Sumitani, K., Ito, D. and Nagumo, M. (2002) *British Journal of Cancer* 86, 1150-1156 .
- [608] Lenz, H.J. (2003) *Cancer Treatment Reviews* 29 Suppl 1, 41-48.
- [609] Kuo, P.-L., Chiang, L.-C. and Lin, C.-C. (2002) *Life Sciences* 72, 23-34.
- [610] Yang, H.-L., Pan, J.-X., Sun, L. and Yeung, S.-C.J. (2003) *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 763-772.
- [611] Javelaud, D. and Besancon, F. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 37949-37954.
- [612] Jones, J.M., Cui, X.S., Medina, D. and Donehower, L.A. (1999) *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 10, 213-222.
- [613] Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (1999) *Experimental Cell Research* 246, 280-289 .
- [614] Wright, W.E. and Shay, J.W. (1992) *Experimental Gerontology* 27, 383-389 .
- [615] Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M. and Scadden, D.T. (2000) *Science (New York, N.Y.)* 287, 1804-1808 .
- [616] Chang, B.D., Broude, E.V., Fang, J., Kalinichenko, T.V., Abdryashitov, R., Poole, J.C. and Roninson, I.B. (2000) *Oncogene* 19, 2165-2170 .
- [617] Fang, L., Igarashi, M., Leung, J., Sugrue, M.M., Lee, S.W. and Aaronson, S.A. (1999) *Oncogene* 18, 2789-2797.
- [618] Kramer, D.L., Chang, B.D., Chen, Y., Diegelman, P., Alm, K., Black, A.R., Roninson, I.B. and Porter, C.W. (2001) *Cancer Research* 61, 7754-7762.
- [619] Hanna, D.E., Rethinaswamy, A. and Glover, C.V. (1995) *The Journal of Biological Chemistry* 270, 25905-25914.
- [620] Kang, J.-Y., Kim, J., Jang, S. and Bae, Y.-S. (2009) *Molecules and Cells*.
- [621] Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J.C. (1996) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13742-13747.
- [622] Ju, Z., Choudhury, A.R. and Rudolph, K.L. (2007) *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 333-344.
- [623] Wagers, A.J. and Conboy, I.M. (2005) *Cell* 122, 659-667 .

- [624] Bischoff, R. and Holtzer, H. (1969) *The Journal of Cell Biology* 41, 188-200 .
- [625] Parker, S.B. et al. (1995) *Science (New York, N.Y.)* 267, 1024-1027 .
- [626] Freermerman, A.J., Vrana, J.A., Tombes, R.M., Jiang, H., Chellappan, S.P., Fisher, P.B. and Grant, S. (1997) *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 11, 504-513.
- [627] Rosato, R.R., Wang, Z., Gopalkrishnan, R.V., Fisher, P.B. and Grant, S. (2001) *International Journal of Oncology* 19, 181-191.
- [628] Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1999) *Genes & Development* 13, 213-224.
- [629] Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1993) *Cell* 72, 309-324.
- [630] Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1994) *Science (New York, N.Y.)* 264, 1467-1471.
- [631] Zacksenhaus, E., Jiang, Z., Chung, D., Marth, J.D., Phillips, R.A. and Gallie, B.L. (1996) *Genes & Development* 10, 3051-3064.
- [632] Ding, Q.M., Ko, T.C. and Evers, B.M. (1998) *The American Journal of Physiology* 275, C1193-1200.
- [633] Tian, J.Q. and Quaroni, A. (1999) *The American Journal of Physiology* 276, C1245-1258.
- [634] Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V. and Seiser, C. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 24834-24843 .
- [635] Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. and Kondo, S. (2005) *Nature Reviews. Cancer* 5, 726-734.
- [636] Levine, B. and Yuan, J. (2005) *The Journal of Clinical Investigation* 115, 2679-2688 .
- [637] Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H. and Lenardo, M.J. (2004) *Science (New York, N.Y.)* 304, 1500-1502.
- [638] Gartel, A.L. and Tyner, A.L. (2002) *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 639-49 .
- [639] Yazbeck, V.Y., Buglio, D., Georgakis, G.V., Li, Y., Iwado, E., Romaguera, J.E., Kondo, S. and Younes, A. (2008) *Experimental Hematology* 36, 443-450.
- [640] Wu, Y.C. et al. (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 382, 451-456 .
- [641] Mazzanti, R., Platini, F., Bottini, C., Fantappiè, O., Solazzo, M. and Tessitore, L. (2009) *Biochemical Pharmacology* 78, 21-32 .
- [642] Nagai, H. et al. (2003) *Cancer Letters* 193, 41-47.
- [643] Kang, K.H., Kim, W.H. and Choi, K.H. (1999) *Experimental Cell Research* 253, 403-412.
- [644] Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993) *Science (New York, N.Y.)* 259, 1769-1771.
- [645] Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R. and Codogno, P. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 18384-18391 .
- [646] Capocefalo, A., Franceschi, V., Whitelaw, C.B.A., Vasey, D.B., Lilloco, S.G., Cavirani, S. and Donofrio, G. (2009) *Journal of Virological Methods* 161, 308-311 .
- [647] Clark, E. et al. (2000) *Journal of Virology* 74, 5040-5052.
- [648] Kawata, S., Ariumi, Y. and Shimotohno, K. (2003) *Journal of Virology* 77, 7291-7299
- [649] Oka, K., Nagano-Fujii, M., Yoshida, I., Hidajat, R., Deng, L., Akutsu, M. and Hotta, H. (2003) *Microbiology and Immunology* 47, 429-438.
- [650] Yoshida, I., Oka, K., Hidajat, R., Nagano-Fujii, M., Ishido, S. and Hotta, H. (2001) *Microbiology and Immunology* 45, 689-697.
- [651] Wu, F.Y. et al. (2003) *Journal of Virology* 77, 1481-1500.
- [652] Dimri, G., Band, H. and Band, V. (2005) *Breast Cancer Research: BCR* 7, 171-179 .

- [653] Alam, S., Sen, E., Brashear, H. and Meyers, C. (2006) *Journal of Virology* 80, 4927-4939
- [654] Finzer, P., Aguilar-Lemarroy, A. and Rösl, F. (2002) *Cancer Letters* 188, 15-24 .
- [655] Järviluoma, A., Child, E.S., Sarek, G., Sirimongkolkasem, P., Peters, G., Ojala, P.M. and Mann, D.J. (2006) *Molecular and Cellular Biology* 26, 2430-2440.
- [656] Amini, S., Khalili, K. and Sawaya, B.E. (2004) *DNA and Cell Biology* 23, 249-260 .
- [657] Vázquez, N. et al. (2005) *Journal of Virology* 79, 4479-4491.
- [658] Zhang, J., Scadden, D.T. and Crumpacker, C.S. (2007) *The Journal of Clinical Investigation* 117, 473-81.
- [659] Wu, W. et al. (2008) *Virology Journal* 5, 41.
- [660] Guendel, I. et al. (2009) *Virology Journal* 6, 114.
- [661] Bacher, S., Achatz, G., Schmitz, M.L. and Lamers, M.C. (2002) *Biochimie* 84, 1207-1220 .
- [662] Chiang, Y., Rizzino, A., Sibenaller, Z.A., Wold, M.S. and Vishwanatha, J.K. (1999) *Molecular and Cellular Biochemistry* 199, 139-147.
- [663] Chrétien, A., Delaive, E., Dieu, M., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Toussaint, O. (2008) *Experimental Gerontology* 43, 353-359.
- [664] Gillette, J.M., Chan, D.C. and Nielsen-Preiss, S.M. (2004) *Journal of Cellular Biochemistry* 92, 820-832.
- [665] Hayes, M.J. and Moss, S.E. (2009) *The Journal of Biological Chemistry* 284, 10202-10210.
- [666] Ryzhova, E.V., Vos, R.M., Albright, A.V., Harrist, A.V., Harvey, T. and González-Scarano, F. (2006) *Journal of Virology* 80, 2694-2704.
- [667] Hoshino, I. et al. (2005) *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7945-7952.
- [668] Sanda, T. et al. (2007) *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 21, 2344-2353.
- [669] Casanova, B., de la Fuente, M.T., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Silva, A., Garcia-Marco, J.A. and Garcia-Pardo, A. (2001) *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 15, 1521-1526.
- [670] Jiang, S.-Y., Chou, J.-M., Leu, F.-J., Hsu, Y.-Y., Shih, Y.-L., Yu, J.-C., Lee, M.-S. and Shyu, R.-Y. (2005) *World Journal of Gastroenterology: WJG* 11, 948-953 .
- [671] Delage-Mourroux, R., Martini, P.G., Choi, I., Kraichely, D.M., Hoeksema, J. and Katzenellenbogen, B.S. (2000) *The Journal of Biological Chemistry* 275, 35848-35856 .
- [672] Emerson, V., Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Wang, I.H., Schnölzer, M., Kempf, T. and Bosch, V. (2009) *Journal of Virology*.
- [673] Héron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N.J.C. and Fernandez, A. (2008) *Journal of Cellular Physiology* 214, 158-165.
- [674] Karmakar, S., Foster, E.A. and Smith, C.L. (2009) *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 124, 1841-1851.
- [675] Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y. and Endo, H. (2006) *The Journal of Biological Chemistry* 281, 36401-36410.
- [676] Kuramori, C. et al. (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 519-525.
- [677] Kurtev, V., Margueron, R., Kroboth, K., Ogris, E., Cavailles, V. and Seiser, C. (2004) *J Biol Chem* 279, 24834-43.
- [678] Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P. and Katzenellenbogen, B.S. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6947-6952.

- [679] Simon, S.L. et al. (2000) *Cancer Research* 60, 2796-2799.
- [680] Demarchi, F. and Schneider, C. (2007) *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6, 136-138 .
- [681] Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. and Wymann, M.P. (2008) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1784, 159-185.
- [682] Samuels, Y. and Ericson, K. (2006) *Current Opinion in Oncology* 18, 77-82 .
- [683] Samuels, Y. et al. (2004) *Science (New York, N.Y.)* 304, 554.
- [684] Baur, M., Gneist, M., Owa, T. and Ditttrich, C. (2007) *Melanoma Research* 17, 329-331 .
- [685] Soon, P.S.H. et al. (2008) *Annals of Surgery* 247, 157-164.
- [686] Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E. and Sherr, C.J. (1993) *Genes & Development* 7, 331-342.
- [687] Tam, S.W., Theodoras, A.M., Shay, J.W., Draetta, G.F. and Pagano, M. (1994) *Oncogene* 9, 2663-2674.
- [688] Jaluria, P., Betenbaugh, M., Konstantopoulos, K. and Shiloach, J. (2007) *BMC Biotechnology* 7, 71.
- [689] Kowantetz, K., Crosetto, N., Haglund, K., Schmidt, M.H.H., Heldin, C.-H. and Dikic, I. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 32786-32795.
- [690] Yang, L., Hamilton, S.R., Sood, A., Kuwai, T., Ellis, L., Sanguino, A., Lopez-Berestein, G. and Boyd, D.D. (2008) *Cancer Research* 68, 4321-4330.
- [691] Zhang, J., Guo, H., Mi, Z., Gao, C., Bhattacharya, S., Li, J. and Kuo, P.C. (2009) *Experimental Cell Research* 315, 304-312.
- [692] Zhong, D., Zhang, J., Yang, S., Soh, U.J.K., Buschdorf, J.P., Zhou, Y.T., Yang, D. and Low, B.C. (2009) *Journal of Cell Science* 122, 414-424.
- [693] Ditzel, H.J., Strik, M.C.M., Larsen, M.K., Willis, A.C., Waseem, A., Kejling, K. and Jensenius, J.C. (2002) *The Journal of Biological Chemistry* 277, 21712-21722 .
- [694] Kato, N., Nakanishi, M. and Hirashima, N. (2006) *J Immunol* 177, 147-54.
- [695] Ho, J.C., Ip, Y.C., Cheung, S.T., Lee, Y.T., Chan, K.F., Wong, S.Y. and Fan, S.T. (2008) *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47, 1524-1532.
- [696] Ono, R., Matsuoka, J., Yamatsuji, T., Naomoto, Y., Tanaka, N., Matsui, H. and Matsushita, M. (2008) *International Journal of Molecular Medicine* 22, 199-203 .
- [697] Schroder, O., Yudina, Y., Sabirsh, A., Zahn, N., Haeggstrom, J.Z. and Stein, J. (2006) *J Lipid Res* 47, 1071-80.
- [698] Guo, S. et al. (2005) *Cancer Research* 65, 3011-3016.
- [699] Huang, C., Rajfur, Z., Yousefi, N., Chen, Z., Jacobson, K. and Ginsberg, M.H. (2009) *Nature Cell Biology* 11, 624-630.
- [700] Bartosch, B. et al. (2003) *The Journal of Biological Chemistry* 278, 41624-41630 .
- [701] Gensert, J.M., Baranova, O.V., Weinstein, D.E. and Ratan, R.R. (2007) *Neurobiology of Disease* 26, 671-680.
- [702] Radford, K.J., Thorne, R.F. and Hersey, P. (1996) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 222, 13-18.
- [703] Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G.V. and Goff, S.P. (1993) *Cell* 73, 1067-1078.
- [704] Tamesa, M.S. et al. (2009) *Electrophoresis* 30, 2168-2181.
- [705] Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.-J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P. and Gaynor, R.B. (2003) *Molecular Cell* 11, 1055-1066.
- [706] Wada, T. et al. (1998) *Genes Dev* 12, 343-56.
- [707] Kimbi, G.C., Kramvis, A. and Kew, M.C. (2005) *World Journal of Gastroenterology: WJG* 11, 6416-6421.
- [708] Chen, G. et al. (2002) *Clin Cancer Res* 8, 2298-305.

- [709] Kadenbach, B., Arnold, S., Lee, I. and Hüttemann, M. (2004) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1655, 400-408.
- [710] Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) *Cell* 86, 147-57.
- [711] Masoudi, M., Saadat, I., Omidvari, S. and Saadat, M. (2009) *Molecular Biology Reports* 36, 781-784.
- [712] Pongstaporn, W., Pakakasama, S., Sanguansin, S., Hongeng, S. and Petmitr, S. (2009) *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 135, 673-678.
- [713] Sun, Y., Li, J.Y., He, J.S., Zhou, L.X. and Chen, K. (2005) *Histopathology* 46, 505-514.
- [714] Li, W. et al. (2000) *Molecular Genetics and Metabolism* 71, 599-608.
- [715] Roberts, S., Mendonça-Torres, M., Jensen, K., Francis, G. and Vasko, V. (2009) *Pathology Oncology Research: POR*.
- [716] Kuefer, M.U. et al. (1996) *Genomics* 35, 392-396.
- [717] Yoneda-Kato, N., Look, A.T., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Raimondi, S.C., Cohen, K.J., Carroll, A.J. and Morris, S.W. (1996) *Oncogene* 12, 265-275.
- [718] Kramer, S., Ozaki, T., Miyazaki, K., Kato, C., Hanamoto, T. and Nakagawara, A. (2005) *Oncogene* 24, 938-944.
- [719] Wang, D., Li, Z., Messing, E.M. and Wu, G. (2002) *J Biol Chem* 277, 36216-22.
- [720] Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A.Y., Walter, J.C. and LaBaer, J. (2004) *Science (New York, N.Y.)* 305, 86-90.
- [721] Nakanishi, M., Kaneko, Y., Matsushime, H. and Ikeda, K. (1999) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263, 35-40.
- [722] Tanaka, T., Ohkubo, S., Tatsuno, I. and Prives, C. (2007) *Cell* 130, 638-650 .
- [723] Barrôco, R.M. et al. (2006) *Plant Physiology* 142, 1053-1064.
- [724] Inzé, D. and De Veylder, L. (2006) *Annual Review of Genetics* 40, 77-105.
- [725] Bird, D.A., Buruiana, M.M., Zhou, Y., Fowke, L.C. and Wang, H. (2007) *Plant Cell Reports* 26, 861-872.
- [726] Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A. and Sekine, M. (2006) *FEBS Letters* 580, 336-340 .
- [727] Mishra, S., Murphy, L.C. and Murphy, L.J. (2006) *J Cell Mol Med* 10, 353-63.
- [728] Mishra, S., Murphy, L.C., Nyomba, B.L. and Murphy, L.J. (2005) *Trends Mol Med* 11, 192-7.
- [729] Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J. and Chellappan, S.P. (2002) *Oncogene* 21, 8388-96.
- [730] Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B. and Chellappan, S. (2003) *J Biol Chem* 278, 47853-61.
- [731] Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U.R. and Rudel, T. (2005) *Nat Cell Biol* 7, 837-43.
- [732] Merkwirth, C. and Langer, T. (2009) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 27-32 .
- [733] Merkwirth, C. and Langer, T. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1793, 27-32.
- [734] Terashima, M., Kim, K.M., Adachi, T., Nielsen, P.J., Reth, M., Köhler, G. and Lamers, M.C. (1994) *The EMBO Journal* 13, 3782-3792.
- [735] Coates, P.J., Jamieson, D.J., Smart, K., Prescott, A.R. and Hall, P.A. (1997) *Current Biology: CB* 7, 607-610.
- [736] Mussi, P., Liao, L., Park, S.-E., Ciana, P., Maggi, A., Katzenellenbogen, B.S., Xu, J. and O'Malley, B.W. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16716-16721.
- [737] Lim, J.-H., Chun, Y.-S. and Park, J.-W. (2008) *Cancer Research* 68, 5177-5184 .
- [738] He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D.M., DeMayo, F.J., Katzenellenbogen, B.S., Lydon, J.P. and O'Malley, B.W. (2008) *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22, 344-360 .

- [739] Bonnet, E., Fostier, A. and Bobe, J. (2007) *BMC Genomics* 8, 55.
- [740] Kirchman, P.A., Miceli, M.V., West, R.L., Jiang, J.C., Kim, S. and Jazwinski, S.M. (2003) *Acta Biochimica Polonica* 50, 1039-1056.
- [741] Cornillez-Ty, C.T., Liao, L., Yates, J.R., Kuhn, P. and Buchmeier, M.J. (2009) *Journal of Virology* 83, 10314-10318.
- [742] Sikora, J. et al. (2009) *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 1703-1709.
- [743] Sun, L., Liu, L., Yang, X.-J. and Wu, Z. (2004) *Journal of Cell Science* 117, 3021-3029.
- [744] Artal-Sanz, M. and Tavernarakis, N. (2009) *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20, 394-401.
- [745] Merkwirth, C. et al. (2008) *Genes & Development* 22, 476-488.
- [746] Osman, C., Merkwirth, C. and Langer, T. (2009) *Journal of Cell Science* 122, 3823-3830.
- [747] Ross, J.A., Nagy, Z.S. and Kirken, R.A. (2008) *The Journal of Biological Chemistry* 283, 4699-4713.
- [748] Coates, P.J., Nenutil, R., McGregor, A., Picksley, S.M., Crouch, D.H., Hall, P.A. and Wright, E.G. (2001) *Experimental Cell Research* 265, 262-273.
- [749] Steglich, G., Neupert, W. and Langer, T. (1999) *Molecular and Cellular Biology* 19, 3435-3442.
- [750] Park, S.-E., Xu, J., Frolova, A., Liao, L., O'Malley, B.W. and Katzenellenbogen, B.S. (2005) *Molecular and Cellular Biology* 25, 1989-1999.
- [751] Cao, G., van der Wijst, J., van der Kemp, A., van Zeeland, F., Bindels, R.J. and Hoenderop, J.G. (2009) *The Journal of Biological Chemistry* 284, 14788-14795 .
- [752] van der Wijst, J., Hoenderop, J.G.J. and Bindels, R.J.M. (2009) *Magnesium Research: Official Organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium* 22, 127-132.
- [753] Bianco, N.R. and Montano, M.M. (2002) *Oncogene* 21, 5233-5244.
- [754] Bitter, G.A. (2007) *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103, 189-195.
- [755] Martini, P.G., Delage-Mourroux, R., Kraichely, D.M. and Katzenellenbogen, B.S. (2000) *Molecular and Cellular Biology* 20, 6224-6232.
- [756] Kim, J.-W. et al. (2009) *Cancer Science*.
- [757] Pabona, J.M.P., Velarde, M.C., Zeng, Z., Simmen, F.A. and Simmen, R.C.M. (2009) *The Journal of Endocrinology* 200, 63-73.
- [758] Umanskaya, K., Radke, S., Chander, H., Monardo, R., Xu, X., Pan, Z.-Q., O'Connell, M.J. and Germain, D. (2007) *Molecular and Cellular Biology* 27, 7615-7622 .
- [759] Murphy, L.C. et al. (2000) *Cancer Research* 60, 6266-6271.
- [760] Parker, L.P., Taylor, D.D., Kesterson, S. and Gercel-Taylor, C. (2009) *Cancer Genomics & Proteomics* 6, 189-194.
- [761] Giannini, R. and Cavallini, A. (2005) *Anticancer Research* 25, 4287-4292.
- [762] Hwang, C., Giri, V.N., Wilkinson, J.C., Wright, C.W., Wilkinson, A.S., Cooney, K.A. and Duckett, C.S. (2008) *Breast Cancer Research and Treatment* 107, 235-242 .
- [763] Dong, Y., Chi, S.L., Borowsky, A.D., Fan, Y. and Weiss, R.H. (2004) *Cellular Signalling* 16, 263-269.
- [764] Lee, S.-J., Choi, D., Rhim, H., Choo, H.-J., Ko, Y.-G., Kim, C.G. and Kang, S. (2008) *Molecular and Cellular Biochemistry* 319, 69-77 .
- [765] Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J. and Chellappan, S.P. (2002) *Oncogene* 21, 8388-8396.
- [766] Wang, S., Nath, N., Fusaro, G. and Chellappan, S. (1999) *Molecular and Cellular Biology* 19, 7447-7460.

- [767] Choi, D., Lee, S.J., Hong, S., Kim, I.H. and Kang, S. (2008) *Oncogene* 27, 1716-1725
- [768] DeGregori, J., Kowalik, T. and Nevins, J.R. (1995) *Molecular and Cellular Biology* 15, 4215-4224.
- [769] Helin, K. (1998) *Current Opinion in Genetics & Development* 8, 28-35.
- [770] Joshi, B., Ko, D., Ordonez-Ercan, D. and Chellappan, S.P. (2003) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312, 459-466.
- [771] Back, J.W. et al. (2002) *Protein Science* 11, 2471-2478 .
- [772] Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J. and Perrot-Applanat, M. (2002) *Cancer Research* 62, 4977-4984.
- [773] Dadiani, M., Seger, D., Kreizman, T., Badikhi, D., Margalit, R., Eilam, R. and Degani, H. (2009) *Endocrine-Related Cancer* 16, 819-834 .
- [774] Jiang, C., Ito, M., Piening, V., Bruck, K., Roeder, R.G. and Xiao, H. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279, 27781-27789.
- [775] Persson, H. and Leder, P. (1984) *Science (New York, N.Y.)* 225, 718-721.
- [776] Cayrol, C. and Ducommun, B. (1998) *Oncogene* 17, 2437-44.
- [777] Coleman, M.L., Marshall, C.J. and Olson, M.F. (2003) *Embo J* 22, 2036-46.
- [778] Hwang, C.Y., Kim, I.Y. and Kwon, K.-S. (2007) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 219-225.
- [779] Lee, J.Y., Yu, S.J., Park, Y.G., Kim, J. and Sohn, J. (2007) *Molecular and Cellular Biology* 27, 3187-3198.
- [780] Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B.A. (1995) *Nature* 378, 785-789.
- [781] McClung, J.K., Jupe, E.R., Liu, X.T. and Dell'Orco, R.T. (1995) *Experimental Gerontology* 30, 99-124.
- [782] Hail, N. and Lotan, R. (2009) *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 49-67 .
- [783] Kim, M.Y., Trudel, L.J. and Wogan, G.N. (2009) *Anticancer Research* 29, 3733-3740
- [784] Maity, R., Sharma, J. and Jana, N.R. (2010) *Journal of Cellular Biochemistry*.
- [785] Thoennissen, N.H. et al. (2010) *Oncogene* 29, 285-296.
- [786] Ziglioli, F., Frattini, A., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffieda, M. and Cortellini, P. (2009) *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis* 80, 13-20.
- [787] Ito, K. et al. (2004) *Cancer Res* 64, 1071-8.
- [788] Oh, S.H. and Lim, S.C. (2009) *J Pharmacol Exp Ther* 329, 112-22.
- [789] Lawlor, M.A. and Rotwein, P. (2000) *Molecular and Cellular Biology* 20, 8983-8995
- [790] La Rocca, S.A., Crouch, D.H. and Gillespie, D.A. (1994) *Oncogene* 9, 3499-3508 .
- [791] Piedra, M.E., Delgado, M.D., Ros, M.A. and León, J. (2002) *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 13, 185-193.
- [792] Ahn, C.S., Lee, J.H., Reum Hwang, A., Kim, W.T. and Pai, H.-S. (2006) *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 46, 658-667.
- [793] Han, Y.-H., Kwon, J.-H., Yu, D.-Y. and Moon, E.-Y. (2006) *Free Radical Research* 40, 1182-1189.
- [794] Wang, X., Chinnam, M., Wang, J., Wang, Y., Zhang, X., Marcon, E., Moens, P. and Goodrich, D.W. (2009) *Molecular and Cellular Biology* 29, 2794-2803.
- [795] Hoentjen, F., Sartor, R.B., Ozaki, M. and Jobin, C. (2005) *Blood* 105, 689-696 .
- [796] Zhang, Z. and Fuller, G.M. (1997) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 90-94.
- [797] Hoque, M., Mathews, M.B. and Pe'ery, T. (2010) *Journal of Cellular Physiology* 223, 224-233 .
- [798] Lu, R. and Serrero, G. (2001) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 142-147.

- [799] Villeneuve, N.F., Sun, Z., Chen, W. and Zhang, D.D. (2009) *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.) 8, 3255-3256 .
- [800] Staversky, R.J., Vitiello, P.F., Gehen, S.C., Helt, C.E., Rahman, A., Keng, P.C. and O'Reilly, M.A. (2006) *Free Radical Biology & Medicine* 41, 601-609 .
- [801] Vitiello, P.F., Wu, Y.-C.M., Staversky, R.J. and O'Reilly, M.A. (2009) *Free Radical Biology & Medicine* 46, 33-41 .
- [802] Barry, S.P., Townsend, P.A., McCormick, J., Knight, R.A., Scarabelli, T.M., Latchman, D.S. and Stephanou, A. (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385, 324-329.
- [803] Foyer, C.H. and Noctor, G. (2009) *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 861-905 .
- [804] Tripathi, B.N., Bhatt, I. and Dietz, K.-J. (2009) *Protoplasma* 235, 3-15 .
- [805] Koorts, A.M. and Viljoen, M. (2007) *Archives of Physiology and Biochemistry* 113, 55-64 .
- [806] Deák, M. et al. (1999) *Nature Biotechnology* 17, 192-196 .
- [807] Briat, J.-F., Duc, C., Ravet, K. and Gaymard, F. (2009) *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- [808] Lee, J.-H., Jang, H., Cho, E.-J. and Youn, H.-D. (2009) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389, 399-404.
- [809] Miscia, S. et al. (2002) *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 13, 13-18 .
- [810] Donato, N.J. and Perez, M. (1998) *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5067-5072.
- [811] Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W. and Goeddel, D.V. (1989) *Cell* 58, 923-931 .
- [812] Fiorillo, C. et al. (2008) *Free Radical Biology & Medicine* 45, 839-846 .
- [813] Llacuna, L., Marí, M., Lluís, J.M., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J.C. and Morales, A. (2009) *The American Journal of Pathology* 174, 1776-1785 .
- [814] Sasaki, M., Ikeda, H., Sato, Y. and Nakanuma, Y. (2008) *Free Radical Research* 42, 625-632 .
- [815] Satoh, K. et al. (2009) *Nature Medicine* 15, 649-656 .
- [816] Lee, S.P., Hwang, Y.S., Kim, Y.J., Kwon, K.S., Kim, H.J., Kim, K. and Chae, H.Z. (2001) *The Journal of Biological Chemistry* 276, 29826-29832 .

## **ANNEXES.**

## Annexe 1

<b>Appareillage/Fournisseur</b>
Autoradiographies : « Molecular Imager PharosFX Plus System » Biorad Laboratories, Inc.
Banques d'ADNc : Maxipréparation d'ADN plasmidique : Plasmid Maxi Kit, Qiagen Inc.
Constructions géniques : Extraction d'ADN plasmidique : Mini kit I plasmide E.Z.N.A.®, VWR
Dosage d'acides nucléiques : Nanodrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific Inc..
Extraction ARN : TriReagent Ambion
Membrane Western Blot : PVDF Immobilon-P Transfer Membrane, 0,45µm, Millipore
Puces à protéines : BIACORE (GE Healthcare) et ProteinChip® (CIPHERGEN)
Révélation ECL Western Blot : « Quantity One 1D » « Molecular Imager ChemiDoc XRS System » Biorad Laboratories, Inc..
Séquençage : MilleGen S.A. Labège, France,
Transfert Western Blot : Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad Inc..
Cytométrie de flux : BD LSRII logiciel FACS DIVA 6
Immunofluorescence : microscope Nikon eclipse 80i, logiciel Genikon
PCR semi-quantitative : SybrGreen, Applied Biosystem Inc.
vecteur pGEMT-easy Promega Corp.
<b>Génotypes</b>
« Bacteriomatch II screening/validation reporter competent cells » : Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 hisB supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' lacIq HIS3 aadA Kanr]
JM109 : endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)
LS180 : N° ATCC CL-187 ( <a href="http://www.atcc.org/">http://www.atcc.org/</a> )
Parragio : <a href="http://www.pi.csiro.au/ahpc/legumes/pdf/paraggio.pdf">http://www.pi.csiro.au/ahpc/legumes/pdf/paraggio.pdf</a>
XL1blue MRF' Kan : Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn5 (Kanr)]
<b>Liens internet</b>
Protocole double hybride bactérien : <a href="http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf">http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf</a>
<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> .
<a href="http://clusters.wallonie.be/rechercheclinique/fr/actualites/2009-10-07-interference-au-niveau-des-interactions-proteine-proteine.html">http://clusters.wallonie.be/rechercheclinique/fr/actualites/2009-10-07-interference-au-niveau-des-interactions-proteine-proteine.html</a> .
<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov">http://ncbi.nlm.nih.gov</a>
<a href="http://plantta.jcvi.org/">http://plantta.jcvi.org/</a>
<a href="http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=TCOFFEE::Advanced">http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&amp;daction=TCOFFEE::Advanced</a>
<a href="http://www.hybrigenics.com/">http://www.hybrigenics.com/</a>

<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed</a>
<a href="http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/">http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/</a>
<a href="http://www.protneteomix.com">http://www.protneteomix.com</a>
<a href="http://www.protneteomix.com/">http://www.protneteomix.com/</a>
<a href="http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf">http://www.stratagene.com/manuals/200412.pdf</a>
<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/">http://www.uniprot.org/uniprot/</a>
<a href="http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Assay/LiquiChipSystem/default.aspx">http://www1.qiagen.com/Products/Protein/Assay/LiquiChipSystem/default.aspx</a>
<a href="http://pim.hybrigenics.com">http://pim.hybrigenics.com</a>
Wellcome Trust Sanger Institute <a href="http://www.sanger.ac.uk/">http://www.sanger.ac.uk/</a>
<a href="http://www.curie.fr">www.curie.fr</a>
<a href="http://www.gnis.fr">www.gnis.fr</a>
<a href="http://www.medicago.org">www.medicago.org</a>
<a href="http://www.pid.nci.nih.gov">www.pid.nci.nih.gov</a>
<a href="http://www.reactome.org">www.reactome.org</a>
<a href="http://www.statistiques-mondiales.com">www.statistiques-mondiales.com</a>

## Annexe 2

SB 2X
Tris-HCl pH 6,8 130mM
glycérol 10%
SDS 1%
beta-mercaptoethanol 50µl/ml
bleu de bromophénol traces

Révélation Western blot ECL
Tris-HCl (pH 8) 100mM
Luminol 1,25mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,6%
Acide-p-coumarique 225µM

SOC	Pour 1L
Bacto-tryptone	20g
Bacto-yeast extract	5g
NaCl	0,5g
KCl 1M	5ml
eau	x ml
pH7, stériliser puis ajouter 20ml de glucose 1M	

Sels M9	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	67,8g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30g/L
NaCl	5g/L
NH <sub>4</sub> Cl	10g/L

Milieu M9 non sélectif	Volume final 500ml
Agar 7,5g	
Eau 380ml	
Stériliser et conserver à 60°C	
Sels M9 50ml	
Additifs M9 67,5ml	
Chloramphenicol 25µg/ml	
Tétracycline 20µg/ml	

Tampon de lyse totale	
Hepes pH7,9 25mM	Aprotinin 5µg/ml
KCl 300mM	Leupeptin 2µg/ml
EDTA 0,2 mM	Pepstatin 0,1µg/ml
Glycerol 10%	PMSF 1µM
NP40 1%	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1mM
	NaF 5mM

TBS-Tween0,05%-BSA1%	
Tris base	1,21 g/L
NaCl	8 g/L
Tween	500µl/L
BSA	10g

LB-agar	
LB (Luria Broth)	20g/L
agar	15g/L

Additifs M9 Volume final 50ml
7.4 ml de Glucose 20%
3.7 ml de Adénine HCl 20 mM
37 ml de His DO 10X
370 µl de MgSO <sub>4</sub> 1M
370 µl de Thiamine HCl 1M
370 µl de ZnSO <sub>4</sub> 10 mM
370 µl de CaCl <sub>2</sub> 100 mM
370 µl de IPTG 100 mM

Milieu M9 double sélectif	Volume final 500ml
Agar 7,5g	
Eau 380ml	
Stériliser et conserver à 60°C	
Sels M9 50ml	
Additifs M9 67,5ml	
Chloramphenicol 25µg/ml	
Tétracycline 20µg/ml	
3-AT 200mM	
Streptomycine 12,5µg/ml	

Solution de perméabilisation et de saturation cytométrie
Triton X-100 0,2%
Albumine de serum bovin 2%
PBS

### Annexe 3

- Amorces PHB2 pour la construction PHB2-pcDNA4/T0 (transfection cellulaire transitoire)

Sens : PHB2FL\_induc\_F : 5'-GGTGGGAATTCGCCACCATGGCCCAGAACTTGAAGG-3'

Antisens : PHB2Fl\_induc\_R : 5'-GCCCTCTAGATCATTCTTACCCTTGATGAG-3'

- Amorces PHB2 pour la PCR semi-quantitative en temps réel

Sens : PHB2\_qPCR55°\_F : 5'-TG TTCACCGTGGAAGGCGG-3'

Antisens : PHB2\_qPCR55°C\_R : 5'-CATCTGTAGGTCTTTGGAGCCT-3'

- Amorces GAPDH pour la PCR semi-quantitative en temps réel

Sens : GAPDH\_qPCR55°\_F : 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

Antisens : GAPDH\_qPCR55°C\_R : 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

---

## Etude des interactions protéine-protéine par double hybride bactérien : applications en Agro-alimentaire et en Santé.

---

Les interactions entre protéines sont un enjeu majeur en recherche. Hautement spécifiques, elles régulent l'organisation cellulaire, ainsi que les réponses aux stimuli extérieurs ; ce sont des cibles idéales des agents thérapeutiques. Diverses techniques d'étude sont disponibles, mais peu d'entre elles permettent d'analyser simultanément plusieurs interactions. L'objectif de ce travail est d'utiliser le double hybride bactérien pour découvrir de nouveaux partenaires de 2 régulateurs de la prolifération tumorale humaine, p21 et STAT3, et en parallèle pour déterminer la fonction de MtSAP1, impliquée dans la germination et la réponse aux stress abiotiques chez *Medicago truncatula*. L'analyse des partenaires potentiels de l'oncogène STAT3 et de l'inhibiteur p21 suggère l'existence de nouveaux mécanismes moléculaires de la tumorigenèse auxquels participerait STAT3, et permet d'envisager de nouvelles hypothèses quant au rôle de p21. Un nouveau complexe, p21/prohibitine2, est étudié mais sa fonction reste supposée : il pourrait agir comme corégulateur transcriptionnel et/ou réguler la protéolyse de p21. L'étude du gène *MtSAP1* et des partenaires d'interactions suggèrent fortement que MtSAP1 serait induit par l'hypoxie : elle jouerait un rôle considérable dans la détoxification et la tolérance de la plante au stress. Ce travail, appuyé par la littérature, met en évidence un lien fonctionnel entre p21, STAT3 et MtSAP1 au cours de l'hypoxie dans les cellules cancéreuses humaines. La confirmation de cette hypothèse permettrait d'approfondir les mécanismes de protection cellulaire face à l'hypoxie, tant au sein des tumeurs humaines que lors de la tolérance de *Medicago truncatula*.

---

## Protein-Protein interactions' studies using bacterial two-hybrid: applications in Foods and Health domains.

---

Protein-protein interaction's studies are a major challenge for current research. These interactions are highly specific and regulate all processes in cell, from metabolism to responses to external stimuli. So they are crucial targets for therapeutics. Many methods are available for study them, but only few allow discovering many protein complexes together, as two-hybrid can do. The goal of this work is to underscore new partners of p21 and STAT3, two major protein involved in tumour control, and on the other side is to define the function of MtSAP1 which is involved in *Medicago truncatula* seed germination and in abiotic stresses' response. STAT3 and p21's potential interacting partners analysis strongly suggest the existence of new tumour molecular mechanisms where STAT3 plays a role, and define new hypothesis for p21's function when the cell enter in a specific process. A new protein complex, p21/prohibitin2, was chosen for a detailed study but its function was only supposed: it could be a transcriptional regulator and/or could be involved in p21 proteolysis. In parallel, *MtSAP1* gene study and two-hybrid analysis strongly suggest the involvement of MtSAP1 during cell response to hypoxia: MtSAP1 would be induce in response to hypoxia and then could have an important role in plant detoxification and tolerance. This work, supported by literature, underscores a link between p21, STAT3 and MtSAP1 during human tumour cell response to hypoxia. The validation of this hypothesis will let to deepen cell protection mechanisms against hypoxia, in human tumour as well as during tolerance establishment in *Medicago truncatula*.

Mots-clés :

Double hybride bactérien, *Medicago truncatula*, p21, STAT3, stress abiotique, MtSAP1.