



Régulation de l'apoptose des lymphocytes T par les protéines de la famille TSC-22D

Aurélie Pepin Pépin

► To cite this version:

Aurélie Pepin Pépin. Régulation de l'apoptose des lymphocytes T par les protéines de la famille TSC-22D. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114814 . tel-00713526

HAL Id: tel-00713526

<https://theses.hal.science/tel-00713526>

Submitted on 2 Jul 2012

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE :

ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1114

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 12/07/2011

par

Aurélie PEPIN

Régulation de l'apoptose des lymphocytes T par les protéines de la famille TSC-22D

Directeur de thèse : Marc PALLARDY

Professeur d'Université (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry)

Composition du jury:

Président du jury :

Christian POÛS

Professeur d'Université (Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry)

Rapporteurs :

Fabrice GOUILLEUX

Directeur de Recherche (CNRS UMR-6239, Tours)

Laurent VERNHET

Professeur d'Université (Faculté de Pharmacie, Rennes I)

Examineur :

Laurent MASCARELL

Chercheur (Stallergènes, Antony)

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	3
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	5
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION.....	10
I. La famille de protéines TSC-22D (Transforming growth factor-beta Stimulated Clone-22 Domain)...	11
1. Classification des différents membres de la famille TSC-22D	11
2. TSC-22 : Transforming growth factor- β Stimulated Clone-22 (TSC-22D1-2).....	13
a. Structure de la protéine TSC-22	13
b. Répartition tissulaire et cellulaire et localisation subcellulaire de TSC-22	15
i. Répartition tissulaire et cellulaire de l'ARNm <i>tsc-22</i> et de la protéine TSC-22	15
ii. Localisation subcellulaire de TSC-22	16
c. Régulation de l'expression de la protéine TSC-22	17
i. Organisation du promoteur de <i>tsc-22</i>	17
ii. Régulation de l'expression de la protéine TSC-22.....	18
d. Fonctions de la protéine TSC-22	21
i. Régulation de la mort cellulaire	21
ii. Effets sur la prolifération cellulaire	21
iii. Régulation de la transcription génique	23
3. GILZ : Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (TSC-22D3-2)	24
a. Structure et localisation subcellulaire de la protéine GILZ	24
i. Structure de la protéine GILZ	24
ii. Localisation subcellulaire.....	26
b. Expression et régulation de l'expression de GILZ	27
i. Expression de GILZ	27
ii. Le promoteur de <i>gilz</i> et sa régulation	28
c. Fonctions de GILZ.....	30
i. Effets anti-inflammatoires	30
ii. Effets sur les fonctions des cellules de l'immunité	31
iii. Effets sur la prolifération cellulaire	32
iv. Régulateur de la survie cellulaire	33
v. Autres fonctions décrites	34
4. Autres protéines de la famille TSC-22D	36
a. Isoformes TSC-22D1.....	36
b. Isoformes TSC-22D2.....	37
c. Isoformes TSC-22D3 : TSC-22D3-1, TSC-22D3-3, TSC-22D3-4 et TSC-22D3-5 (L-GILZ)	38
i. Structure des isoformes TSC-22D3.....	39
ii. Fonctions des isoformes TSC-22D3.....	41
d. Isoformes TSC-22D4.....	42
i. Structure des isoformes	42
ii. Isoforme TSC-22D4-1 : TSC-22 Homologous Gene-1 (THG-1).....	43
e. Bun, les protéines homologues de TSC-22 chez la drosophile.....	45
5. Fonctions du domaine TSC-22	46
a. Rôles du domaine TSC-22.....	46
b. Interactions entre protéines.....	48

II. Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T	49
1. Activation des lymphocytes T et expansion clonale	49
a. Initiation de la réponse immunitaire	49
b. Expansion clonale.....	53
c. Différenciation des lymphocytes T mémoires	56
2. Apoptose des lymphocytes T	57
a. Mécanismes de l'apoptose des cellules eucaryotes	59
b. « Activation Induced Cell Death »: AICD.....	64
c. Apoptose par déprivation en facteurs de croissance	67
i. Description du mécanisme	68
ii. Rôle de la protéine BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)	72
iii. Description de la protéine BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)	73
iv. Régulation de l'activité de BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)	77
III. Rôle des facteurs FOXO (Forkhead box O) dans la mort cellulaire	80
1. Description de la famille FOXO	80
a. Structure	81
b. Régulation de l'activité des protéines FOXO	83
2. Mécanismes des effets pro-apoptotiques.....	85
RESULTATS	88
I. Objectifs du travail.....	89
II. Article 1: TSC-22 increases T cell apoptosis upon interleukin-2 withdrawal through inhibition of GILZ expression and BIM down-regulation.....	92
III. Résultats complémentaires : Etude des mécanismes de l'inhibition de l'expression de GILZ par TSC-22.....	123
1. Introduction	123
2. Matériels et méthodes.....	124
3. Résultats	129
a. Régulation de la transcription de <i>gilz</i> par TSC-22 via une modification de l'activité transcriptionnelle de FOXO3	129
b. Localisation subcellulaire de TSC-22.....	138
c. Interaction entre TSC-22 et GILZ	140
II. Article 2. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner.....	143
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	158
I. Discussion	159
1. TSC-22 augmente l'apoptose des lymphocytes T déprivés en IL-2.....	159
2. TSC-22 diminue l'expression de GILZ induite lors de la déprivation en IL-2.....	162
3. TSC-22 régule-t-il l'activité de FOXO3 ?	166
4. TSC-22 interagit-il avec GILZ ?	168
5. GILZ régule la localisation de FOXO3 et donc son activité transcriptionnelle.	170
II. Perspectives : Fonctions des protéines TSC-22D lors de l'homéostasie lymphocytaire.	172
III. Conclusion	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	177

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Protéines de la famille TSC-22D identifiées chez la souris et chez l'homme.....	12
Tableau 2. Schéma des plasmides utilisés.	125
Figure 1. Représentation schématique d'une protéine de la famille TSC-22D	11
Figure 2. Alignement des séquences murine (m-TSC-22) et humaine (h-TSC-22) de TSC-22.....	14
Figure 3. Représentation schématique de la protéine TSC-22 humaine.	14
Figure 4. Représentation schématique du promoteur de <i>tsc-22</i> murin	18
Figure 5. Représentation schématique des îlots CpG sur le promoteur de <i>tsc-22</i> murin.....	18
Figure 6. Alignement des séquences murine (m-GILZ) et humaine (h-GILZ) de GILZ	25
Figure 7. Alignement des séquences humaines de GILZ et TCS-22	25
Figure 8. Représentation schématique de la protéine GILZ humaine.	26
Figure 9. Représentation schématique du promoteur de <i>gilz</i> humain.....	28
Figure 10. Représentation schématique des mécanismes mis en jeu par GILZ pour inhiber l'apoptose des lymphocytes T.....	34
Figure 11. Représentation schématique de certaines fonctions de GILZ.....	35
Figure 12. Représentation schématique de l'organisation du gène <i>tsc-22d1</i> humain.....	37
Figure 13. Représentation schématique de l'organisation du gène <i>tsc-22d2</i> humain.	38
Figure 14. Alignement des différentes protéines issues du gène <i>tsc-22d3</i> par rapport à GILZ murin.	39
Figure 15. Schéma du promoteur de <i>tsc-22d3</i> murin et des ARNm et protéines exprimées.....	40
Figure 16. Représentation du site d'initiation de la traduction de <i>l-gilz</i> murin.....	41
Figure 17. Représentation schématique de l'organisation du gène <i>tsc-22d4</i> humain.....	43
Figure 18. Alignement des séquences murine (m-THG-1) et humaine (h-THG-1) de la protéine THG-1 ..	44
Figure 19. Représentation schématique des différentes isoformes Bun.	46
Figure 20. Alignement de XTSC-22 (de <i>Xenopus laevis</i> et de <i>Xenopus tropicalis</i>) avec les protéines TSC-22 murine et humaine.....	47
Figure 21. Les différentes phases de la réponse immunitaire.....	49
Figure 22. Organisation moléculaire de la plateforme du lymphocyte T de la synapse immunologique..	51
Figure 23. Schéma de la synapse immunologique entre un LT (T cell) et une cellule présentatrice d'antigène (APC).....	52
Figure 24. Effet de l'IL-2 sur les différentes sous-populations de LT.	55
Figure 25. Schéma de la réponse immunitaire.....	58
Figure 26. Représentation schématique des caspases..	60
Figure 27. Les caspases induisent la destruction des structures cellulaires vitales et des organites.	62
Figure 28. Les cellules apoptotiques expriment des ligands qui induisent leur phagocytose.	63
Figure 29. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	66
Figure 30. La voie intrinsèque de l'apoptose dans les lymphocytes T.	68
Figure 31. Activation de BAX et BAK et formation des pores dans la membrane mitochondriale.....	70
Figure 32. Schéma des protéines de la famille Bcl-2 exprimées chez les mammifères.	74
Figure 33. Représentation schématique des différents domaines des trois isoformes de BIM.....	75
Figure 34. Alignement des différentes isoformes humaines de BIM.....	76
Figure 35. Schéma récapitulatif de la régulation de l'activité de la protéine BIM.	79
Figure 36. Représentation schématique de la structure primaire des protéines FOXO.	81
Figure 37. Représentation schématique de la régulation de la localisation subcellulaire des protéines FOXO, en présence de facteurs de croissance (A) ou dans de conditions de stress (B).	83
Figure 38. Les facteurs de transcription FOXO peuvent induire l'apoptose via des mécanismes dépendants ou indépendants de la mitochondrie.	86
Figure 39. Effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3 WT.	130
Figure 40. Effet de la co-transfection de pcDNA3, pRc/RSV et pBLAST sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et l'expression protéique de FOXO3.	131
Figure 41. Effet de la co-transfection de pcDNA3 et de pRc/RSV-FOXO3 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3, ainsi que l'expression protéique de FOXO3	134

Figure 42. Effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3, ainsi que l'expression protéique de FOXO3.	135
Figure 43. Localisation subcellulaire des protéines FOXO3 et TSC-22 exogènes.	139
Figure 44. Interaction entre les protéines GILZ et TSC-22 exogènes.	141
Figure 45. Schéma récapitulatif des mécanismes régulés par GILZ et TSC-22 au cours de l'apoptose des cellules CTLL-2 déprivées en IL-2.....	164
Figure 46. Schéma récapitulatif des hypothèses proposées à propos des mécanismes régulant l'expression de GILZ et TSC-22 et leur interaction au cours de l'apoptose de lymphocytes T déprivés en IL-2.....	175

PRINCIPALES ABREVIATIONS

AICD : Activation-Induced Cell Death
BAK : Bcl-2 homologous Antagonist-Killer
BAX : Bcl-2–Associated X protein
Bcl-2 : B-cell-lymphoma 2
BH : Bcl-2 Homology
BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
CMV : CytomégaloVirus
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
Crm-1 : Chromosomal Region Maintenance protein 1
DBD : DNA Binding Domain
DED : Death Effector Domain
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase
FHRE : Forkhead Response Element
FOXO : Forkhead box class O
GC : Glucocorticoid
GILZ : Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper
GRE : Glucocorticoid Response Element
HTLV : Human T-Lymphotropic Virus
IKK : I κ B Kinase
IL-2 : Interleukine-2
IRS : Insulin Response Sequence
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
LBD : Light chain-Binding Domain
LT : Lymphocyte T
LZ : Leucine Zipper
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MCL1 : Myeloid Cell Leukemia sequence 1
NES : Nuclear Export Sequence

NFκB : Nuclear Factor- κB

NLS : Nuclear Localisation Signal

NK : Natural Killer

PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase

PKB (ou Akt) : Protein Kinase B

PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

RSV : Rous sarcoma virus

TCR : T Cell Receptor

TGF-β : Transforming Growth Factor-beta

THG-1 : TSC-22 Homologous Gene-1

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand

TSC-22 : TGF-β Stimulated clone 22

TSC-22D : TGF-β Stimulated clone 22 Domain

TSC-box: Tuberous Sclerosis Complex box

AVANT-PROPOS

Les lymphocytes T, ayant proliféré lors de la réponse immunitaire, grâce à la présence d'un facteur de croissance, l'interleukine-2 (IL-2), vont entrer en apoptose en fin de réponse immunitaire, du fait de la disparition d'IL-2 dans le milieu environnant. Il a été montré que l'expression de la protéine GILZ est induite lors de la déprivation en IL-2 d'une lignée de lymphocytes T murins cytotoxiques, la lignée cellulaire CTLL-2. Dans ces conditions, la protéine GILZ retarde l'entrée en apoptose des cellules CTLL-2 déprivées en IL-2. Dans ce cas, GILZ inhibe l'activité du facteur de transcription FOXO3, responsable de l'expression des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose, telles que BIM.

La famille de protéines TSC-22D (Transforming Growth Factor- β Stimulated Clone 22 Domain) comprend, entre autres, les protéines GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) et TSC-22 (Transforming Growth Factor- β Stimulated Clone 22). Ces protéines présentent une forte homologie de séquence.

La fonction de la protéine TSC-22 a été très peu étudiée dans les cellules hématopoïétiques. Elle a cependant été décrite comme une protéine capable d'augmenter l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires tumorales.

L'objectif de ce travail était de déterminer le rôle des protéines de la famille TSC-22D au cours de l'apoptose des lymphocytes T induite par la déprivation en IL-2.

La première partie du travail a consisté à montrer que TSC-22 augmentait l'apoptose de la lignée cellulaire CTLL-2, déprivée en IL-2. Dans ces conditions, nous avons démontré que TSC-22 augmentait l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, en induisant l'expression de la protéine BIM, résultant alors en l'activation des caspases-9 et -3. GILZ étant un régulateur négatif de l'expression de BIM, nous avons analysé son expression dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2. Nous avons montré que l'expression de la protéine GILZ, induite au cours de la déprivation en IL-2, était régulée négativement en présence de TSC-22. La diminution de l'expression de la protéine GILZ était due à une diminution de l'expression de son ARNm en présence de TSC-22. Nous avons de plus montré que la stabilité de l'ARNm de *gilz* n'était pas modifiée par TSC-22.

Dans un second temps, nous avons exploré différentes pistes afin de déterminer le ou les mécanismes par le(s)quel(s) TSC-22 régulait l'expression de GILZ. L'expression de GILZ

a été décrite comme étant induite par le facteur de transcription FOXO3 dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2. Nous avons donc, d'une part, déterminé si la protéine TSC-22 était capable de réguler l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Dans la lignée cellulaire HL-60, nous avons montré que TSC-22 pouvait diminuer l'activité du facteur de transcription FOXO3. Nous avons, d'autre part, déterminé par immunofluorescence la localisation de TSC-22 et FOXO3 dans les CTLL-2 déprivées en IL-2. Ces deux protéines, localisées dans le cytoplasme, migrent dans le noyau au cours de la déprivation en IL-2. Ces résultats suggèrent donc que TSC-22 pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et, par conséquent, diminuer la transcription de *gilz*.

D'autre part, il a été montré précédemment que GILZ inhibait l'activité du facteur de transcription FOXO3. Au cours de mon travail de thèse, j'ai collaboré au travail de Perle Latré de Laté, qui s'est intéressée au mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par GILZ. Nous avons tout d'abord montré que GILZ inhibait l'activité transcriptionnelle de FOXO1 et FOXO4, outre celle de FOXO3. Nous avons ensuite montré que cette inhibition était indépendante des kinases Akt/PKB et IKK, connues pour réguler l'activité des facteurs FOXO. Enfin, nous avons montré que la protéine GILZ, présente dans le cytoplasme, était capable de relocaliser FOXO3, alors nucléaire, dans le cytoplasme. Cette relocalisation a été montrée comme impliquant un mécanisme de transport de type Crm-1.

INTRODUCTION

I. La famille de protéines TSC-22D (Transforming growth factor-beta Stimulated Clone-22 Domain)

1. Classification des différents membres de la famille TSC-22D

La famille TSC-22D est constituée de protéines possédant toutes une séquence homologue : le domaine TSC-22 (Transforming Growth Factor-beta Stimulated Clone-22). Ce domaine consiste en un domaine leucine zipper (LZ) et une TSC-box (Tuberous Sclerosis Complex-box), qui sont localisés plutôt dans la partie C-terminale des protéines (Khoury *et al.*, 2008).

Le domaine LZ, s'organise en une hélice α amphipatique, permettant à la protéine d'interagir avec une autre protéine comportant ce même domaine pour former une « glissière à leucines ». Les dimères formés peuvent être des homo-dimères ou des hétéro-dimères (Kester *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2007).

Le domaine TSC-box a été très peu caractérisé. Il serait nécessaire, avec le domaine LZ, à la dimérisation des protéines (Kester *et al.*, 1999). La dimérisation des protéines ainsi que le rôle de ce domaine seront discutés dans un paragraphe ultérieur (cf page 46).

Une région riche en prolines et acides glutamiques a été identifiée à l'extrémité C-terminale de ces protéines. Cette région (Pro) qui s'organise en une hélice polyproline de type II lévogyre, permettrait l'interaction avec des protéines possédant un domaine SH3 (Src Homology domain 3) (Reiersen and Rees 2001). Cependant, aucune interaction de ce type n'a été décrite à ce jour.

Enfin, la région N-terminale est la région la plus variable parmi toutes ces protéines et elle serait à l'origine des différences de fonction observées entre les protéines de cette famille (figure 1).

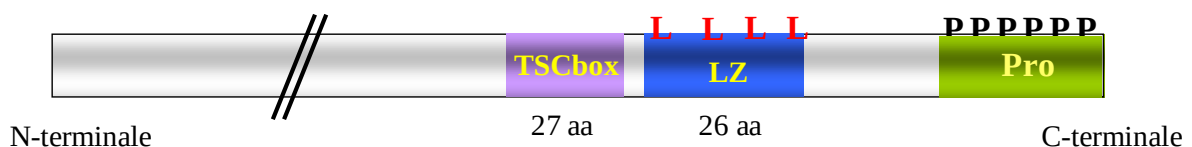


Figure 1. Représentation schématique d'une protéine de la famille TSC-22D. Les domaines TSC-box, Leucine Zipper (LZ) et la région riche en Proline (Pro) sont indiqués. Les lettres L et P correspondent aux acides aminés Leucine et Proline. aa : acides aminés.

Gènes	Noms des protéines	Taille (nucléotides)	Taille (acides aminés)	Chromosome et locus
tsc-22d1	TSC-22D1-1	4581 (souris)	1057 (souris) 1073 (homme)**	Chr 14 locus D3 (souris) Chr 13 locus q14 (homme)
	TSC-22D1-2 ou TSC-22	1670 (souris)	143 (souris) 144 (homme)	
	TSC-22D1-3	ND	742 (homme)	
	TSC-22D1-4	ND	585 (homme)	
tsc-22d2	TSC-22D2-1	2102 (souris)	167 (souris)	Chr 3 locus D (souris) Chr 3 locus q25.1 (homme)
	TSC-22D2-2	2229 (souris)	ND	
	TSC-22D2-3	1364 (souris)	ND	
	TSC-22D2-4	ND	780 (homme)	
	TSC-22D2-5	ND	124 (homme)	
	TSC-22D2-6	ND	87 (homme)	
tsc-22d3	TSC-22D3-1 ou GILZ 2*	1377 (souris)	201 (souris)	Chr X locus F1 (souris) Chr X locus q22.3 (homme)
	TSC-22D3-2 ou GILZ ou GILZ 1*	1972 (souris) ND (homme)	137 (souris) 134 (homme)	
	TSC-22D3-3 ou GILZ 4*	ORF : 243 (souris)	80 (souris)	
	TSC-22D3-4 ou GILZ 3*	ORF : 132 (souris)	43 (souris)	
	TSC-22D3-5 ou L-GILZ	ORF : 705 (souris)	234 (souris)	
tsc-22d4	TSC-22D4-1 ou THG-1	2672 (souris) ND (homme)	387 (souris) 395 (homme)	Chr 5 locus G1 (souris) Chr 7 locus p21-15 (homme)
	TSC-22D4-2	ND	310 (souris)	
	TSC-22D4-3	ND	195 (souris)	

Tableau 1. Protéines de la famille TSC-22D identifiées chez la souris et chez l'homme. ND : Non Déterminé. ORF : Open Reading Frame. D'après Fiol *et al.* (Fiol *et al.*, 2007). * : d'après Soundararajan *et al.* (Soundararajan *et al.*, 2007). ** : d'après Hömig-Hölzel *et al.* (Hömig-Hölzel *et al.*, 2011).

Les protéines de la famille TSC-22D sont codées, chez les mammifères, par quatre gènes différents (*tsc-22d1* à *tsc-22d4*) localisés sur divers chromosomes (tableau 1). Plusieurs isoformes issues d'épissage alternatif sont décrites pour chaque gène. Les différents transcrits

sont numérotés, comme décrit par Fiol et collaborateurs, dans leur ordre de taille : par exemple, le gène *tsc-22d1* code pour les deux isoformes TSC-22D1-1 et TSC-22D1-2 (tableau 1) (Fiol *et al.*, 2007).

Des protéines homologues ou orthologues de celles de la famille TSC-22D ont été identifiées chez d'autres organismes.

Ainsi, une protéine homologue de TSC-22 a été caractérisée dans le cerveau du porc. Il s'agit d'une molécule de 77 acides aminés. Son nom est DIP (DSIP-Immunoreactive Peptide), car la protéine a été détectée avec un anticorps anti-DSIP (Sillard *et al.*, 1993). Le gène codant pour cette protéine n'a pas été identifié.

Un gène unique, nommé *Bunched*, code pour plusieurs protéines chez *Drosophila melanogaster* : les protéines sont appelées Bun, et les isoformes sont au nombre de six (BunA à BunF) (Gluderer *et al.*, 2008). Ce gène avait été dénommé *shortsighted* lors de sa découverte (Treisman *et al.*, 1995).

Le gène *ostf1* (Osmotic Stress Transcription Factor 1) a, quant à lui, été identifié dans les branchies d'un poisson Tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Fiol and Kultz 2005). Il est induit de manière rapide et transitoire suite à un stress hyperosmotique (Fiol *et al.*, 2007).

Les protéines les mieux caractérisées au sein de cette famille sont TSC-22 et GILZ. Elles seront donc décrites les premières.

2. TSC-22 : Transforming growth factor- β Stimulated Clone-22 (TSC-22D1-2)

Le gène murin *tsc-22* a été isolé pour la première fois en 1992 lors d'une analyse soustractive d'ADN complémentaires d'ostéoblastes murins (MC3T3 E1) traités ou non pendant une à deux heures par le Transforming-Growth Factor-beta 1 (TGF- β 1) (Shibanuma *et al.*, 1992). Le gène humain a été cloné en 1996 à partir d'une banque d'ADN extraits d'embryons humains âgés de six semaines (Jay *et al.*, 1996).

a. Structure de la protéine TSC-22

La protéine humaine TSC-22 est composée de 144 acides aminés et la protéine murine de 143 acides aminés. Elles sont homologues à 98,5% : un seul acide aminé diffère entre ces

deux espèces (figure 2). Les protéines de la souris et du rat sont identiques à 100%, bien que le gène de rat soit homologue à 97% avec le gène murin (Hamil and Hall 1994). Leur poids moléculaire est d'environ 18kDa.

```

m-TSC 22 1   MKSQWCRPVAMD LGVYQLRHFSISFLSSLLGTENASVRLDNSS-GASVVAIDNKIEQAMD 59
             |||
h-TSC 22 1   MKSQWCRPVAMD LGVYQLRHFSISFLSSLLGTENASVRLDNSSSGASVVAIDNKIEQAMD 60

60   LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENLLKTLASPEQLAQFQAQLQTGSPP 119
             |||
61   LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENLLKTLASPEQLAQFQAQLQTGSPP 120

120   ATTQPQGTTPPAQPASQSGSTA 143
             |||
121   ATTQPQGTTPPAQPASQSGPTA 144

```

Figure 2. Alignement des séquences murine (m-TSC-22) et humaine (h-TSC-22) de TSC-22. La région encadrée correspond au domaine leucine zipper. Un trait vertical est dessiné pour les acides aminés identiques.

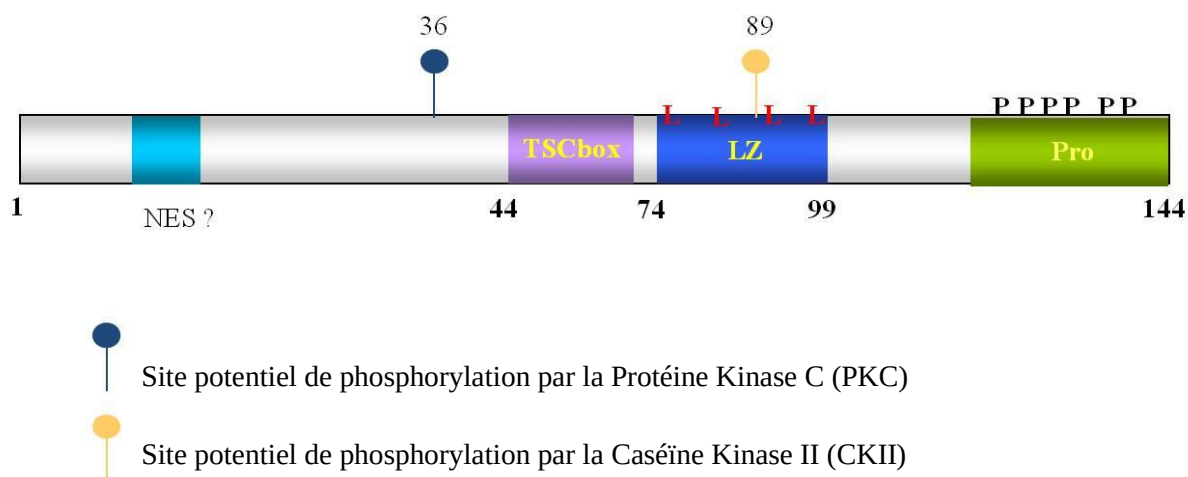


Figure 3. Représentation schématique de la protéine TSC-22 humaine. Les domaines TSC-box, Leucine Zipper (LZ), la région riche en Proline (Pro) et le Signal d'Export Nucléaire (NES) putatif sont indiqués. Les lettres L et P correspondent aux acides aminés Leucine et Proline. Les nombres indiquent les acides aminés.

La protéine est composée d'un domaine LZ, d'une TSC-box, et d'une région riche en prolines (figure 3). Plusieurs sites d'intérêt ont été identifiés par analyse informatique : un site potentiel de phosphorylation par la Caséine Kinase II (glutamine en position 89) et un site de

phosphorylation par la Protéine Kinase C (Sérine Valine Arginine : aa 36 à 38) (Ohta *et al.*, 1996). En position N-terminale se trouve également une séquence consensus NES (Nuclear Export Signal), bien que sa fonctionnalité n'ait pas été testée (Hino *et al.*, 2000). Les régions en amont de la TSC-box et en aval du domaine LZ sont appelées Domaines Répresseurs (RD1 et RD2) : ces domaines sont décrits dans un paragraphe ultérieur (page 24).

b. Répartition tissulaire et cellulaire et localisation subcellulaire de TSC-22

i. Répartition tissulaire et cellulaire de l'ARNm *tsc-22* et de la protéine TSC-22

L'expression de l'ARNm de *tsc-22* dans différents tissus humains a été déterminée par Northern-Blot. Celui-ci est détecté dans les poumons, le cœur, le cerveau, les reins, le placenta, le thymus, la prostate, les ovaires, l'intestin grêle et le colon (Ohta *et al.*, 1996). L'expression dans les reins et les testicules humains est faible, et l'ARNm de *tsc-22* est très peu exprimé dans le foie, le pancréas, la rate, et les leucocytes du sang périphérique (Ohta *et al.*, 1996). L'équipe de P. Berta a aussi analysé par Northern-Blot la répartition tissulaire de *tsc-22* (Jay *et al.*, 1996). Les résultats sont similaires à ceux de Ohta et collaborateurs (Ohta *et al.*, 1996).

L'expression de la protéine TSC-22 au cours de l'embryogénèse a également été analysée chez la souris. La protéine TSC-22 est présente de façon ubiquitaire dès le sixième jour et sa quantité augmente au cours du temps (Dohrmann *et al.*, 1999). TSC-22 serait plus particulièrement localisé au niveau des sites d'interactions entre mésenchyme et épithélium (Dohrmann *et al.*, 1999). L'expression de TSC-22 dans ces tissus serait due en partie à la présence du TGF- β (Kester *et al.*, 2000).

La protéine TSC-22 a été identifiée dans des lignées cellulaires originaires de différents tissus, telles que la lignée cellulaire d'ostéoblastes murins MC3T3 E1 (Shibanuma *et al.*, 1992), la lignée de cellules hypophysaires de rat GH3 (Ohta *et al.*, 1996), la lignée cellulaire HSC-39, dérivée de cellules humaines gastriques (Ohta *et al.*, 1997), ou dans les follicules pileux murins (Soma *et al.*, 2003).

Au contraire, l'expression de TSC-22 a été décrite comme étant régulée négativement dans divers types de cellules cancéreuses.

L'analyse d'échantillons de tumeurs de patients, en comparaison à des échantillons sains, a permis de mettre en évidence une régulation négative voire une inhibition de l'expression de TSC-22 dans différents types de tumeurs cérébrales (Shostak *et al.*, 2003; Shostak *et al.*, 2005), de tumeurs de glandes salivaires (Nakashiro *et al.*, 1998), et de cancers de la prostate (Rentsch *et al.*, 2006). Les mécanismes responsables de cette diminution d'expression n'ont pas été décrits dans ces types cellulaires.

L'expression de TSC-22 est également plus faible dans des cellules cancéreuses hématopoïétiques par rapport à des cellules contrôles saines. En effet, différentes lignées de leucémies lymphoïdes, telles que les cellules murines EL-4, L1210, TK-1, et YAC-1 ou la lignée dérivée d'un plasmocytome murin P1.17, expriment moins de TSC-22 que les cellules saines. La régulation négative de l'expression de TSC-22 a également été observée dans des cellules leucémiques issues de lymphocytes T (LT) ou de cellules Natural Killer (NK) produites à partir de souris transgéniques pour la cytokine IL-15 (Yu *et al.*, 2009).

ii. Localisation subcellulaire de TSC-22

TSC-22 est décrit comme une protéine cytoplasmique dans les cellules cultivées en conditions normales.

Cependant, TSC-22 peut être localisé dans le noyau de certaines cellules qui rentrent en apoptose. Ainsi, TSC-22 surexprimé dans la lignée de cellules TYS, une lignée de cellules cancéreuses de la glande salivaire humaine, migre du cytoplasme vers le noyau quand les cellules sont traitées par une molécule anticancéreuse pro-apoptotique, le 5-Fluoro-Uracile (Hino *et al.*, 2000). Cette translocation nucléaire, suite à un signal pro-apoptotique, a également été décrite dans les cellules HSG (Human Salivary Gland Cancer Cells), les cellules HeLa et les cellules CHO, malgré l'absence de Nuclear Localisation Signal (NLS) (Hino *et al.*, 2002).

Par ailleurs, TSC-22 peut être localisé dans le noyau des follicules pileux murins (Soma *et al.*, 2003). Cette localisation ne serait pas exclusivement associée aux follicules en apoptose.

c. Régulation de l'expression de la protéine TSC-22

i. Organisation du promoteur de *tsc-22*

Le gène *tsc-22d1* est localisé sur le chromosome 13 au niveau du locus q14 chez l'homme (Jay *et al.*, 1996; Khoury *et al.*, 2008). L'ADN complémentaire est composé de 1716 bases, et présente un signal de polyadénylation et une queue polyA, après la base 1716.

Le gène humain est composé de trois exons et de deux introns (Uchida *et al.*, 2003). Un autre exon ainsi qu'un second site d'initiation de la transcription ont été identifiés en amont du site d'initiation de la transcription décrit par Uchida et collaborateurs (Uchida *et al.*, 2003; Khoury *et al.*, 2008). Ce second site est responsable de l'expression des autres transcrits du gène *tsc-22d1* (cf page 36). Le premier exon, composé de 374 paires de bases, contient le codon initiateur et un NES putatif (Hino *et al.*, 2000). La TSC-box est codée par les exons 2 et 3, composés respectivement de 52 et 1351 paires de bases. Le troisième exon contient également le domaine LZ, le codon stop et la région non traduite (3'UTR) (Uchida *et al.*, 2003). Il existe trois copies de la séquence ATTTA dans cette région non traduite (3'UTR), qui seraient responsables de l'instabilité de l'ARNm de *tsc-22* (Uchida *et al.*, 2003).

Le promoteur du gène *tsc-22* humain a été cloné en 2003 (Uchida *et al.*, 2003). Il est composé de 2146 paires de bases. Le promoteur ne possède pas de TATA box canonique mais présente une séquence TATAT et une CCAAT box. Le site d'initiation de la transcription est situé 29 paires de bases en aval de la séquence TATAA. Il contient des sites de fixation pour les facteurs de transcription AP-1, MyoD et trois sites de fixation pour SP1 (en position -413, -120, -78) (figure 4). Les sites SP1 (Specificity Protein 1) pourraient contribuer à l'activation du promoteur par la vesnarinone, un inhibiteur de phosphodiesterase 3. Un site RARE (Retinoic Acid Response Element), pouvant fixer l'ATRA (All-Trans-Retinoic-Acid) serait localisé en position -1299, et plusieurs copies de la séquence CCAAT, fixant l'AMP-c (Adénosine Monophosphate cyclique), également appelées séquences CRE (c-AMP Response Element), seraient présentes sur le promoteur (positions -1898, -1673, -1589, -1358, -1072 et -55). La portion du promoteur contenant les éléments régulateurs responsables de la plus grande activité est la région la plus proche de la CCAAT box, c'est-à-dire la région entre les paires de bases -809 et -29 (Uchida *et al.*, 2003).

Une mutation de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en position -396 (A→G) sur le promoteur de *tsc-22* humain a été identifiée chez des sujets japonais atteints de diabète

de type 2. Cette mutation ne modifierait pas l'activité du promoteur, mais serait corrélée à une augmentation du risque de néphropathie (Sugawara *et al.*, 2003).

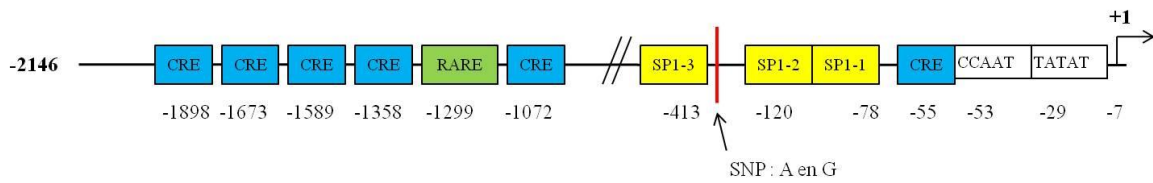


Figure 4. Représentation schématique du promoteur de *tsc-22* murin. Les sites de fixation pour les facteurs de transcription ont été représentés (RARE : Retinoic Acid Response Element ; CRE : C-AMP Response Element ; SP1 : Specificity Protein 1). +1 : Site d'initiation de la transcription. SNP : Single Nucleotide Polymorphism.

ii. Régulation de l'expression de la protéine TSC-22

L'expression de TSC-22 est inexistante dans certaines lignées de leucémies de lymphocytes T ou de cellules Natural Killer, telles que les cellules murines L1210, EL-4, TK-1, YAC-1 (Yu *et al.*, 2009). L'inhibition de l'expression de *tsc-22* dans ces cellules est due à une hyperméthylation du promoteur. En effet, l'utilisation d'un agent déméthylant, le 5-aza-2'-déoxycytidine, restaure l'expression de TSC-22 dans les lignées cellulaires (Yu *et al.*, 2009). La méthylation consiste en une modification de l'ADN dans la région 5' des promoteurs, sur des sites spécifiques appelés îlots CpG. Ces îlots CpG sont des séquences d'ADN riches en bases cytosine et guanine : le nombre de bases C+G est supérieur à 50% du nombre total de bases. Ainsi, des îlots CpG ont été identifiés sur le promoteur humain de *tsc-22*, entre les paires de bases +100 et +450 et sur le promoteur murin entre les paires de bases -300 et +100 (Uchida *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2009) (figure 5).



Figure 5. Représentation schématique des îlots CpG sur le promoteur de *tsc-22* murin. Les îlots CpG sont schématisés par une barre verticale. TSS : Site d'initiation de la transcription. D'après Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2009).

Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de TSC-22 ont également été mis en évidence. Ainsi, le TGF- β régule l'expression de TSC-22 en augmentant la stabilité de son ARNm (Uchida *et al.*, 2003). Dans la région 3'UTR, une séquence (GCUUGC) permettant la fixation de TGF- β ainsi que 3 copies de la séquence Shaw-Kamens (AUUUA), également nommée séquence en éléments riches en AU ont été identifiées. Une protéine pouvant se lier à la dernière de ces séquences a été identifiée. Sa liaison est diminuée en présence de TGF- β . Les auteurs supposent donc que cette protéine non déterminée régulerait la dégradation de l'ARNm de *tsc-22* (Uchida *et al.*, 2003).

Le TGF- β régulerait également l'expression de TSC-22 dans les cellules mésangiales murines primaires. Le traitement de ces cellules par le TGF- β induit une régulation positive du micro-RNA216a (mi-R216a), qui à son tour diminue l'expression de la protéine Ybx1 (Y-box binding protein 1). Ybx1 colocalise avec les « P-bodies » (cytoplasmic Processing bodies) au sein des cellules mésangiales où il forme un complexe de type ribonucléoprotéique avec l'ARNm de *tsc-22*. Le TGF- β , diminuant l'expression de Ybx1, augmente donc la traduction de TSC-22 (Kato *et al.*, 2010).

Le TGF- β serait aussi un inducteur de l'expression de TSC-22 dans la lignée de kératinocytes humains HaCat (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

Le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1- β , induisent la transcription de l'ARNm de *tsc-22* dans des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC). Cette induction est rapide et transitoire (Ohta *et al.*, 1996).

Il a également été décrit que d'autres molécules augmentent la transcription de *tsc-22* dans diverses lignées cellulaires. Ainsi, le Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA), l'ATRA ou le dB-cAMP (dibutyryl-cyclic AMP), mais aussi des facteurs de croissance, tels que le sérum, le Fibroblast Growth Factor (FGF) ou l'Epidermal Growth Factor (EGF) augmentent transitoirement l'ARNm de *tsc-22* (Shibanuma *et al.*, 1992; Trenkle *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 2003).

Par ailleurs, des hormones peuvent aussi réguler l'expression de TSC-22. Ainsi, TSC-22 est un gène cible de la progestérone dans la lignée cellulaire T47D, une lignée de cellules épithéliales mammaires cancéreuses (Kester *et al.*, 1997). Au contraire, TSC-22 est régulé négativement par le 17- β -œstradiol dans les cellules MCF-7, une lignée de cellules humaines mammaires cancéreuses (Tynan *et al.*, 2004). Par ailleurs, la Follicle-Stimulating

Hormone (FSH) induit la transcription rapide et transitoire de l'ARNm de *tsc-22* dans les cellules de Sertoli de rat (Hamil and Hall 1994). Cette induction est indépendante d'une synthèse protéique. Enfin, les glucocorticoïdes, dont la dexaméthasone, augmentent l'expression de TSC-22 dans les ostéoblastes murins MC3T3 E1 (Shibanuma *et al.*, 1992).

L'expression de TSC-22 peut également être régulée par des molécules utilisées en thérapeutique. Le phénobarbital diminue la quantité d'ARNm de *tsc-22* dans le foie des rats traités (Hamadeh *et al.*, 2002). Une benzodiazépine, l'oxazépam, diminuerait également l'ARNm de *tsc-22* dans le foie des souris traitées (Iida *et al.*, 2005; Iida *et al.*, 2007). La vesnarinone, ou 3,4-dihydro-6-[4-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1h)-quinolinone, un inhibiteur de phosphodiesterase 3, induit la transcription de *tsc-22* dans les cellules TYS (Kawamata *et al.*, 1998). Un agoniste du PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma), la rosiglitazone, augmente l'expression de l'ARNm de *tsc-22* dans des cellules primaires humaines issues de cancer de la prostate (Xu *et al.*, 2003), et dans différentes lignées de cellules épithéliales coliques (MOSER S (M-S), FET, CBS) (Gupta *et al.*, 2003). Cette induction directe, est indépendante de la voie du TGF- β et est spécifique du récepteur PPAR γ (Gupta *et al.*, 2003).

L'irradiation par les rayons X de kératinocytes humains primaires induit la régulation positive de l'expression de TSC-22 (Koike *et al.*, 2005). Le traitement de la lignée de kératinocytes humains HaCat par des rayons Ultra-Violet induit aussi l'expression de TSC-22 (Cho *et al.*, 2007).

Enfin, la régulation positive de l'expression de TSC-22 a été observée dans la lignée cellulaire fibroblastique diploïde humaine HDF Tig3 et dans des mélanocytes humains primaires, dans lesquels l'oncogène BRAF^{E600} (B-Raf ou v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) a été surexprimé (Homig-Holzel *et al.*, 2011). Dans ces cellules, l'inactivation par shRNA du facteur de transcription C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein β) inhibe l'expression de TSC-22, suggérant son rôle dans l'induction de la transcription de *tsc-22*. Bien que deux sites potentiels de fixation pour le facteur C/EBP β aient été identifiés en amont du premier exon de *tsc-22*, ce facteur ne se fixe pas directement sur le promoteur de *tsc-22*, mais régulerait indirectement la transcription de ce gène (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

d. Fonctions de la protéine TSC-22

i. Régulation de la mort cellulaire

La surexpression de TSC-22 dans les cellules HSC39, une lignée cellulaire de carcinome gastrique humain, induit l'apoptose via l'activation de la caspase-3 (Ohta *et al.*, 1997). En effet, un inhibiteur spécifique des caspases, Ac-DED-CHO, diminue le pourcentage de cellules en apoptose, alors qu'un inhibiteur de protéases de type ICE (Interleukin-1- β -Converting Enzyme), également appelé caspase-1, n'a aucun effet (Ohta *et al.*, 1997).

TSC-22 est, par ailleurs, capable d'augmenter l'apoptose induite par différents traitements anticancéreux. Ainsi, la surexpression de TSC-22 dans des clones de la lignée TYS augmente leur sensibilité à trois médicaments anticancéreux (5-Fluoro-Uracile, cis-diaminodichloroplatinum, peplomycine) (Uchida *et al.*, 2000). La mort induite par le 5-FU et par TSC-22 présente les caractéristiques d'une mort apoptotique (Uchida *et al.*, 2000). L'apoptose induite par une irradiation aux rayons X est également augmentée par la surexpression de TSC-22 dans des clones de cellules TYS (Hino *et al.*, 2002).

D'autre part, il a été montré que l'activité pro-apoptotique de TSC-22 pouvait être régulée par une protéine anti-apoptotique, la Fortiline (Lee *et al.*, 2008). Cette protéine, qui est nucléaire, est exprimée dans la lignée cellulaire SKOV-3, issue d'un carcinome ovarien humain. Dans ces cellules, la Fortiline, grâce à son domaine N-terminal, a la capacité de se lier aux domaines TSC-box et LZ de la protéine TSC-22. Cette interaction entraîne l'accélération de la dégradation de TSC-22 et par conséquent, une diminution de l'apoptose des cellules SKOV-3. Au contraire, l'invalidation par ARN interférant de l'expression de la Fortiline, augmente l'apoptose caspase-dépendante des cellules SKOV-3 (Lee *et al.*, 2008).

ii. Effets sur la prolifération cellulaire

La protéine TSC-22 inhibe la prolifération cellulaire, ce qui a été démontré dans différentes lignées cellulaires.

La rosiglitazone ainsi que le TGF- β , sont des molécules capables d'une part, d'induire l'expression de TSC-22, et d'autre part, d'inhiber la prolifération de cellules de carcinome colique (Moser S (M-S)). En effet, ces molécules régulent positivement l'expression de la protéine p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1), un inhibiteur de la progression du cycle

cellulaire (Gupta *et al.*, 2003). Un dominant négatif de TSC-22, composé uniquement des domaines TSC-box et LZ, et donc capable d'interagir avec TSC-22, inhibe l'expression de p21 dans les cellules M-S traitées par le TGF- β ou la rosiglitazone ; ce qui démontre l'effet antiprolifératif de TSC-22 (Gupta *et al.*, 2003).

TSC-22 possède une activité antiproliférative quand il est surexprimé dans les cellules TYS. Ainsi, l'augmentation de son expression par la vesnarinone, diminue la prolifération de ces cellules en les bloquant en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Kawamata *et al.*, 1998). Par ailleurs, des expériences *in vivo* réalisées en implantant à des souris nude des cellules TYS transfectées, soit avec un vecteur d'expression codant pour TSC-22 WT, soit avec le vecteur d'expression contrôle, ont montré que l'expression de TSC-22 WT est corrélée à la diminution de la taille de la tumeur induite par les cellules TYS (Nakashiro *et al.*, 1998).

TSC-22 inhibe également la prolifération des cellules hématopoïétiques. La surexpression de TSC-22 par transfection d'un vecteur d'expression dans diverses lignées cellulaires, telles que les cellules 32D, une lignée cellulaire de progéniteurs myéloïdes murins, la lignée de lymphomes B murins WEHI-231, et les lignées leucémiques humaines U937 et HL-60, inhibe en effet leur prolifération (Lu *et al.*, 2007).

Des clones de lymphomes YAC-1, transfectés avec un vecteur d'expression codant pour TSC-22, prolifèrent moins rapidement *in vitro* que des clones de cellules YAC-1 transfectés avec un vecteur vide (Yu *et al.*, 2009). De plus, des expériences de tumorigénèse, réalisées en injectant ces clones de cellules YAC-1 à des souris nude démontrent que la taille de la tumeur induite par les cellules YAC-1 est diminuée en présence de TSC-22 (Yu *et al.*, 2009).

D'autre part, le travail de Yu et collaborateurs a permis de mettre en évidence la méthylation du promoteur de *tsc-22* et par conséquent l'inhibition de son expression dans des leucémies de souris transgéniques pour l'IL-15 (Yu *et al.*, 2009). Des expériences de transfert adoptif visant à réimplanter ces cellules leucémiques à des souris sauvages irradiées ont été menées. Les souris ont ensuite été soumises à des injections sous-cutanées soit d'un agent déméthylant, le 5-aza-2'déoxycytidine, soit de son véhicule. Les résultats démontrent que l'expression de l'ARNm de *tsc-22* est régulée positivement chez les souris traitées par l'agent déméthylant. De plus, la survie des souris traitées par le 5-aza-2'déoxycytidine, est augmentée par rapport à celle des souris témoins ; cette survie est proportionnelle au nombre de traitements réalisés (Yu *et al.*, 2009).

Ces résultats démontrent donc que l'expression de TSC-22 est régulée négativement

dans différentes lignées leucémiques hématopoïétiques, car il inhibe leur prolifération.

L'effet anti-prolifératif de TSC-22 a par ailleurs été démontré dans les cellules fibroblastiques HDF Tig3, surexprimant BRAF^{E600}. En effet, la surexpression de TSC-22, induite par la présence de BRAF^{E600}, est corrélée à une diminution de la prolifération de ces cellules et à une induction de la sénescence (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

iii. Régulation de la transcription génique

Quelques gènes ont été décrits comme étant des gènes cibles de TSC-22.

D'une part, TSC-22 diminuerait l'expression de GADD45 β (Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 β). En effet, l'inhibition de l'expression de TSC-22, suite à un traitement par l'oxazépam d'une lignée de cellules hépatiques (BNL-CL.2), induit une régulation positive de GADD45 β (Iida *et al.*, 2007).

D'autre part, TSC-22 pourrait réguler positivement l'expression du C- type Natriuretic Peptide (CNP). L'expression de TSC-22 semble être corrélée à une augmentation de la transcription du gène *cnp* dans des cellules GH3. TSC-22 est en effet capable de se lier à une séquence riche en GC du promoteur de *cnp* (Ohta *et al.*, 1996).

Enfin, TSC-22 induit l'expression de la protéine Colla2 (Collagen, type I, alpha 2) dans les cellules mésangiales murines primaires (Kato *et al.*, 2010). TSC-22, dont l'expression est régulée positivement par le TGF- β , peut interagir avec le facteur de transcription TFE3 (Transcription Factor E3). Le complexe TSC-22/TFE3 se lie aux domaines E-box, présents dans la région distale du promoteur du gène *colla2*, et induit par conséquent sa transcription. La protéine TFE3 possède un domaine leucine zipper ; l'étude de Kato et collaborateurs démontre par modélisation, mais pas expérimentalement, que ce domaine LZ est impliqué dans l'interaction avec TSC-22 (Kato *et al.*, 2010).

Ces différents travaux démontrent donc que TSC-22 peut réguler négativement ou positivement la transcription génique. TSC-22 serait en effet capable de se fixer au promoteur de ses gènes cibles, soit directement, soit sous forme de complexe avec un autre facteur de transcription.

L'activité transcriptionnelle de TSC-22 a, par ailleurs, été étudiée par diverses équipes.

L'équipe de Hino et collaborateurs a évalué indirectement cette activité en utilisant des constructions de plasmide codant pour la protéine TSC-22 « full-length », ou la protéine TSC-22 délétée de ses domaines N- et C-terminaux et fusionnées à un domaine de liaison à l'ADN GAL4 (Hino *et al.*, 2000). La protéine TSC-22 « full length » est capable d'induire la transcription dans les cellules CHO, et non dans les cellules HSG et les cellules HeLa. L'activité du mutant de TSC-22 est plus importante que celle de la protéine « full length », ce qui suggère que les domaines N- et C-terminaux de TSC-22 sont des domaines répresseurs de l'activité de TSC-22 (Hino *et al.*, 2000).

L'équipe de Kester et collaborateurs a également montré que ces domaines N- et C-terminaux possédaient une activité répressive (Kester *et al.*, 1999). Des tests d'activité transcriptionnelle, réalisés avec la protéine TSC-22 fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, montrent que TSC-22 inhibe l'activité transcriptionnelle d'un plasmide rapporteur contenant les séquences consensus GAL. L'utilisation de mutants de TSC-22 démontre que TSC-22 peut exercer son activité répressive uniquement s'il est présent sous forme d'homo-dimères (Kester *et al.*, 1999).

3. GILZ : Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (TSC-22D3-2)

La protéine murine GILZ a été découverte en 1997 lors d'une analyse soustractive d'ADN complémentaires isolés de thymocytes de souris traités ou non avec un glucocorticoïde, la dexaméthasone (D'Adamio *et al.*, 1997). La protéine humaine a été identifiée en 2001 à partir d'une banque d'ADN de lymphocytes T humains (Cannarile *et al.*, 2001).

a. Structure et localisation subcellulaire de la protéine GILZ

i. Structure de la protéine GILZ

La protéine humaine est composée de 134 acides aminés et la protéine murine de 137 acides aminés. L'homologie de séquence est de 89% entre les ARNm et de 97% dans la région codante (figure 6).

De plus, un domaine PDZ, constitué des quatre derniers acides aminés des protéines, a été identifié. Cependant, aucune interaction *via* ce domaine n'a été décrite.

Enfin, des sites potentiels de phosphorylation ont été identifiés. Selon Cannarile et collaborateurs, les sérines 88 et 114 ainsi que la thréonine 8 seraient des sites consensus de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) (Cannarile *et al.*, 2001). De plus, les sérines 102, 114, 133 et la thréonine 8 seraient phosphorylées par les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). Enfin, un site de glycosylation (Asparagine 19) et un site de phosphorylation par la GSK3 (Glycogen Synthetase Kinase 3) ou par la Plk (Polo-like-kinase) (Thréonine 95) ont été identifiés par analyse bio-informatique (figure 8).

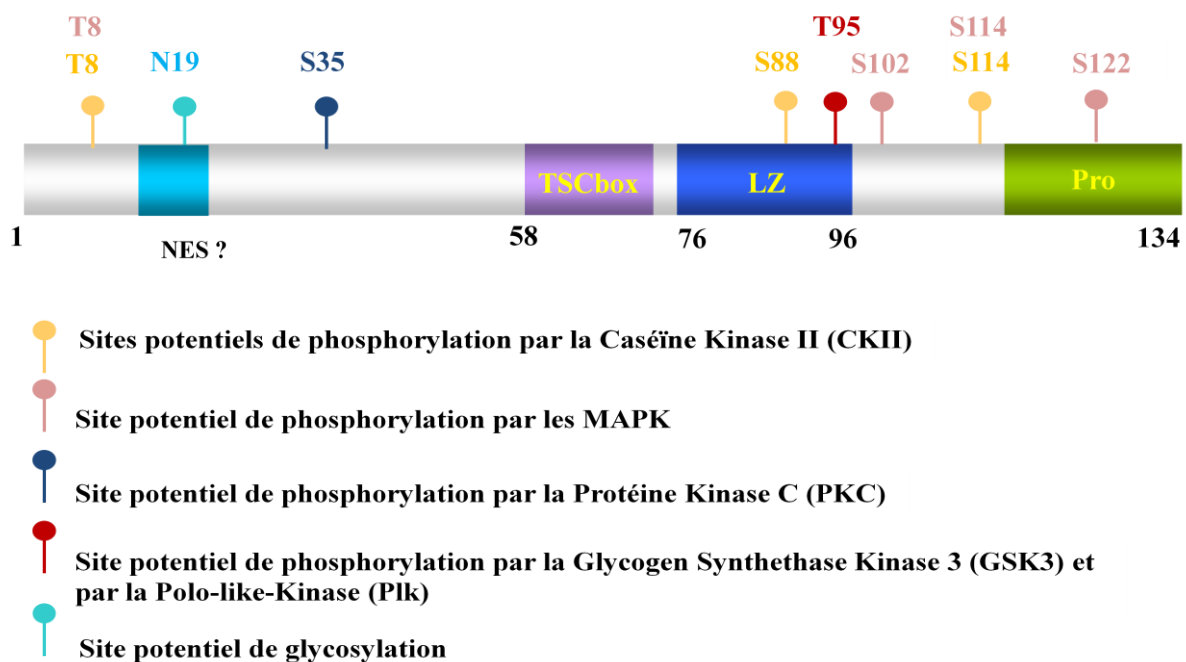


Figure 8. Représentation schématique de la protéine GILZ humaine. Les domaines TSC-box, Leucine Zipper (LZ), la région riche en Proline (Pro) et le Signal d'Export Nucléaire (NES) putatif sont indiqués. Les lettres S et T correspondent respectivement aux acides aminés Sérine et Thréonine.

ii. Localisation subcellulaire

Un site consensus NES (Signal d'Export Nucléaire) existe dans la région N-terminale de la protéine GILZ, mais sa fonctionnalité n'a pas été étudiée. La localisation subcellulaire de GILZ a cependant été recherchée dans différentes cellules. GILZ a été décrit comme une protéine cytoplasmique quand il est surexprimé dans les cellules COS-7 (Ayroldi *et al.*, 2002),

dans la lignée de cellules hématopoïétiques HL-60, ou dans les cellules CTLL-2, une lignée de lymphocytes T murins (Latre de Late *et al.*, 2010).

Cependant, la protéine GILZ peut être localisée dans le noyau dans d'autres conditions. C'est le cas quand il est surexprimé dans les cellules 3DO, un hybridome T murin (D'Adamio *et al.*, 1997), ou quand il est induit par la dexaméthasone dans les cellules C3H10T1/2, des cellules pluripotentes différenciées en adipocytes (Shi *et al.*, 2003). Enfin, au sein du laboratoire, GILZ a été retrouvé dans le noyau quand il est surexprimé en présence de FOXO3 (Forkhead box O3) dans les cellules HL-60 (Latre de Late *et al.*, 2010).

b. Expression et régulation de l'expression de GILZ

i. Expression de GILZ

GILZ est une protéine présente dans de nombreux tissus humains, mis à part le foie et le pancréas (Cannarile *et al.*, 2001). On le retrouve ainsi dans le muscle squelettique, le cerveau, le cœur, les poumons, les reins et la rate (Cannarile *et al.*, 2001). GILZ a également été détecté dans différents organes murins, tels que la rate, le foie, la moelle osseuse, les poumons, les ganglions lymphatiques, et le thymus (D'Adamio *et al.*, 1997).

Au sein du tissu hématopoïétique, GILZ est exprimé dans les cellules souches CD34⁺ murines, les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes T et B matures murins (D'Adamio *et al.*, 1997). GILZ est également exprimé dans les cellules de Kupffer humaines (Hamdi *et al.*, 2007) et les mastocytes humains (Godot *et al.*, 2006). L'expression de l'ARNm de *gilz* a aussi été retrouvée par Northern-Blot dans différentes lignées cellulaires d'origine hématopoïétique : HL-60, HUT78, U937, THP-1, ainsi que JD38 et NAMALWA (Cannarile *et al.*, 2001).

Par ailleurs, GILZ est exprimé dans des cellules épithéliales humaines, localisées dans les bronches supérieures (Eddleston *et al.*, 2007), dans la capsule enveloppant le cristallin de l'œil (Gupta *et al.*, 2007) ou dans de nombreux types neuronaux (du bulbe olfactif à la moelle épinière) (Yachi *et al.*, 2007).

ii. Le promoteur de *gilz* et sa régulation

Le promoteur de *gilz* humain, localisé sur le locus q22.3 du chromosome X (Cannarile *et al.*, 2001), a été caractérisé au sein de notre laboratoire (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Sa séquence est constituée de 2,25 Kb en amont de l'exon 1 du gène *gilz*. Le site d'initiation de la transcription et la TATA box ont été identifiés par la technique de primer extension. La TATA box est située 23 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Des séquences consensus pour la fixation de facteurs de transcription ont été identifiées (figure 9). Sont présents des sites pour la fixation des facteurs de transcription Oct-1/2, c-Myc, STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6), NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cell) (figure 9). Aucune étude fonctionnelle n'a encore été publiée concernant ces sites.

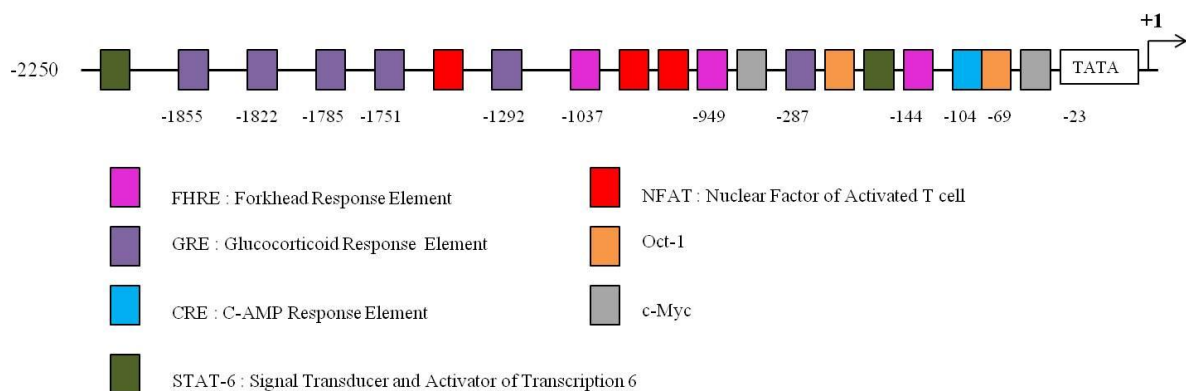


Figure 9. Représentation schématique du promoteur de *gilz* humain. La TATA box est indiquée à droite. Le site d'initiation de la transcription est identifié par le chiffre +1. Les éléments de réponse sont schématisés de différentes couleurs et leurs noms sont indiqués en-dessous. La position des GRE, des FHRE, du site CRE et de la TATA box sont indiqués en-dessous. D'après Asselin-Labat *et al.* (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Trois éléments de réponse aux facteurs de transcription Forkhead box Class O (FOXO), appelés FHRE, ont été caractérisés (figure 9) (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Ces facteurs FOXO seront décrits dans un paragraphe ultérieur (page 80). Les facteurs FOXO peuvent être activés lors d'une déprivation des cellules en facteurs de croissance. Ainsi, précédemment, au sein du laboratoire, il a été démontré que l'expression de GILZ était induite par FOXO3 lors de la déprivation des cellules CTLL-2 en interleukine-2 (IL-2) (Asselin-

Labat *et al.*, 2004). Au contraire, en présence d'IL-2, le facteur FOXO3 est phosphorylé, donc inactif, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'expression de GILZ (Asselin-Labat *et al.*, 2005). Par ailleurs, des tests d'activité transcriptionnelle menés au laboratoire ont permis de montrer que les séquences FHRE coopèrent avec les séquences GRE (Glucocorticoid Response Element) pour augmenter l'expression de GILZ induite par la dexaméthasone (Asselin-Labat *et al.*, 2005).

Plusieurs éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) sont ainsi répartis sur le promoteur dont quatre sont regroupés dans la région distale (figure 9). Des tests d'activité transcriptionnelle ont permis de montrer qu'aucune de ces séquences GRE n'est indispensable individuellement mais que la mutation de toutes les séquences GRE inhibe l'induction de l'expression de GILZ par la dexaméthasone (Asselin-Labat *et al.*, 2005). La régulation de l'expression de GILZ par les glucocorticoïdes a effectivement été décrite dans différents types cellulaires et notamment dans les cellules hématopoïétiques. D'Adamio et collaborateurs ont montré l'induction de l'ARNm de *gilz* dans les lymphocytes T isolés de la rate, ou des ganglions lymphatiques, et dans les thymocytes (D'Adamio *et al.*, 1997). GILZ est aussi régulé positivement par la dexaméthasone dans les monocytes, et les macrophages (Berrebi *et al.*, 2003), les cellules dendritiques dérivées de monocytes ou de cellules souches CD34+ (Cohen *et al.*, 2006) et les mastocytes (Godot *et al.*, 2006). La dexaméthasone, en synergie avec une cytokine, l'IL-15, augmente aussi l'expression de GILZ dans les cellules Natural Killer (NK) et les cellules Natural Killer T (NKT) (Perez *et al.*, 2005).

D'autres hormones, comme l'aldostérone, un minéralocorticoïde, ou la vasopressine, une hormone anti-diurétique, induisent l'expression de GILZ dans les cellules rénales (Muller *et al.*, 2003; Soundararajan *et al.*, 2005).

Les œstrogènes régulent l'expression de GILZ (Tynan *et al.*, 2004). Un site de liaison pour CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein), proche d'un site Oct-1, a été identifié dans la région proximale du promoteur (-104 à -69). Ce site permet la liaison indirecte du récepteur des oestrogènes au promoteur de *gilz* et la régulation de sa transcription (Tynan *et al.*, 2004). Ainsi, le 17- β -œstradiol, un œstrogène, inhibe l'expression de GILZ dans les cellules MCF-7, alors qu'il la régule positivement dans les cellules HeLa ou HEK-293 (Tynan *et al.*, 2004).

Des molécules autres que les hormones stéroïdiennes ont été décrites pour réguler

l'expression de GILZ. Ainsi, des cytokines, telles que l'interleukine-10 (IL-10), ayant des propriétés anti-inflammatoires, augmentent l'expression de GILZ dans les macrophages (Berrebi *et al.*, 2003), les cellules dendritiques (Cohen *et al.*, 2006) et les mastocytes (Godot *et al.*, 2006). Le TGF- β induit également l'expression de GILZ dans les cellules dendritiques (Cohen *et al.*, 2006). L'erythropoïétine (Epo), le Stem Cell Factor (SCF), en synergie avec les glucocorticoïdes, augmentent la quantité de GILZ dans des progéniteurs érythroïdes primaires murins (Kolbus *et al.*, 2003).

c. Fonctions de GILZ

Le rôle de GILZ a principalement été étudié dans le système immunitaire. Il a ainsi été démontré que cette protéine pouvait réguler diverses fonctions des cellules hématopoïétiques.

i. Effets anti-inflammatoires

Les glucocorticoïdes sont des molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires et GILZ mime en partie leurs effets.

L'expression de GILZ dans la lignée monocyttaire THP-1, induite par la dexaméthasone ou l'IL-10, inhibe l'expression des molécules de surface CD80 et CD86 ainsi que la production des chimiokines RANTES (Regulated on Activation Normal T cell expressed and Secreted), également appelée CCL5, et MIP1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) aussi dénommée CCL3 (Berrebi *et al.*, 2003). La production des chimiokines RANTES et MIP1 α est également diminuée en présence de GILZ, induit par la dexaméthasone ou l'IL-10 dans les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (Cohen *et al.*, 2006).

Par ailleurs, GILZ, induit par les glucocorticoïdes dans les cellules souches mésenchymateuses murines dérivées de la moelle osseuse, est capable d'inhiber l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2), induite par les cytokines pro-inflammatoires IL1- β et TNF- α , en régulant l'activité de NF- κ B (Yang *et al.*, 2008). GILZ, dont l'expression est induite dans les macrophages murins par les glucocorticoïdes, inhibe également la régulation positive des cytokines IL-6 et TNF- α provoquée par le LPS. Dans ces cellules, l'invalidation de la protéine Annexine-1, un médiateur connu des glucocorticoïdes, diminue l'expression de

GILZ. Ce résultat suggère que les glucocorticoïdes induisent l'expression de GILZ par un mécanisme impliquant l'Annexine-1 dans ce modèle (Yang *et al.*, 2009).

La régulation négative de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par GILZ a également été mise en évidence *in vivo*, en utilisant un modèle murin d'inflammation colique, développée par le DNBS (DiNitroBenzene Sulfonic acid) (Cannarile *et al.*, 2009). Différentes souris ont été utilisées pour réaliser ces expériences : d'une part, des souris transgéniques sur-exprimant GILZ dans les lymphocytes T et d'autre part, des souris sauvages soit traitées avec de la dexaméthasone, soit ayant reçu par injection la protéine de fusion TAT-GILZ, avant l'induction de l'inflammation colique. Les différents résultats ont montré que la présence de GILZ protège les souris de l'inflammation. En effet, le nombre de lymphocytes T infiltrant le site inflammatoire est plus faible dans les souris exprimant GILZ. De plus, GILZ, en inhibant l'activité de NF- κ B diminue la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ) chez ces souris. Il en résulte une diminution de la réponse inflammatoire et donc des dommages tissulaires (Cannarile *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent donc que GILZ participe à la diminution de l'inflammation, induite par les glucocorticoïdes, dans ce modèle de colite murin (Cannarile *et al.*, 2009).

ii. Effets sur les fonctions des cellules de l'immunité

GILZ possède, en outre, la capacité de modifier *in vitro* les propriétés des lymphocytes T et des cellules dendritiques.

L'expression de GILZ induite par les glucocorticoïdes ou l'IL-10 dans les cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes, modifie l'expression des molécules de surface, impliquées dans l'interaction et l'activation des LT. Ainsi, l'expression des marqueurs de co-stimulation CD80, CD83 et CD86, est inhibée en présence de GILZ et au contraire, l'expression des molécules tolérogènes B7-H1/CD274 et ILT3/CD85k, ainsi que la production d'IL-10 sont augmentées (Cohen *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que la présence de GILZ dans les cellules dendritiques leur confère un phénotype de cellules dendritiques « tolérogènes ».

Lorsque GILZ est surexprimé *via* un système lentiviral dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains, on retrouve une augmentation de la différenciation des LT

CD4⁺ antigène-spécifiques en lymphocytes T régulateurs, caractérisés par l'expression du facteur FOXP3 (Forkhead box P3), de la molécule CD25, et capables de produire de l'IL-10 (Hamdi *et al.*, 2007). Une diminution de la prolifération des LT spécifiques de l'antigène est également observée quand les cellules dendritiques expriment la protéine GILZ (Hamdi *et al.*, 2007).

D'autre part, la réponse des lymphocytes T effecteurs peut aussi être orientée par GILZ. En effet, la surexpression de cette protéine, dans des lymphocytes T de souris transgéniques pour GILZ, favorise la différenciation des lymphocytes T effecteurs en lymphocytes Th2. Ils sécrètent ainsi plus de cytokines de type Th2, telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10 et moins de cytokines de type Th1. Cette orientation est due à une augmentation de l'expression des facteurs de transcription GATA-3 et STAT-6, inducteurs de la voie Th2, et à une diminution de l'expression du facteur T-bet, nécessaire à l'induction de la voie Th1 (Cannarile *et al.*, 2006).

iii. Effets sur la prolifération cellulaire

La protéine GILZ a été décrite comme un inhibiteur de la prolifération des cellules hématopoïétiques.

La surexpression de GILZ dans les hybridomes 3DO augmente le pourcentage de cellules en phase G0/G1, ce qui signifie que la progression du cycle cellulaire est altérée (Ayroldi *et al.*, 2007). En effet, la surexpression de GILZ est corrélée à une expression plus faible de la cycline D1 ainsi qu'à une phosphorylation réduite de la protéine pRB (la protéine du rétinoblastome) ; ces protéines étant impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Ayroldi *et al.*, 2007).

L'inhibition de la prolifération cellulaire est due à la capacité de GILZ à interagir avec différentes protéines de la voie de signalisation ERK (Extracellular-signal Regulated Kinases), que sont la petite protéine G Ras et Raf, un effecteur de Ras (Ayroldi *et al.*, 2007; Beaulieu and Morand 2011). L'interaction directe de GILZ avec Ras, dans sa forme activée, impliquant le domaine TSC-box de GILZ, a été observée *in vitro* et *in vivo* dans les cellules COS-7 et les hybridomes 3DO traités par la dexaméthasone (Ayroldi *et al.*, 2007). L'interaction de GILZ avec Raf-1, *via* son domaine N-terminal, a été démontrée dans les

thymocytes murins et dans les cellules COS-7 (Ayroldi *et al.*, 2002; Ayroldi *et al.*, 2007). Ces interactions ont pour conséquence une diminution de la phosphorylation de ERK, démontrée dans les cellules NIH 3T3 surexprimant GILZ (Ayroldi *et al.*, 2007).

La voie de signalisation PI3K-Akt/PKB est également régulée par GILZ. En effet, la diminution de la phosphorylation de la kinase Akt/PKB a été observée dans les cellules NIH 3T3, ce qui explique la diminution de l'expression de la cycline D1 (Ayroldi *et al.*, 2007).

iv. Régulateur de la survie cellulaire

Enfin, GILZ est capable de moduler l'apoptose des cellules hématopoïétiques.

Des souris transgéniques surexprimant GILZ dans les lymphocytes T et les thymocytes ont été obtenues par l'équipe de Delfino et collaborateurs (Delfino *et al.*, 2004). L'apoptose spontanée des thymocytes isolés de ces souris transgéniques est supérieure à celle des thymocytes issus de souris contrôles. Dans ces thymocytes, la surexpression de GILZ serait corrélée à une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL, ainsi qu'à une augmentation de l'activation des caspases-8 et -3 (Delfino *et al.*, 2004). GILZ augmente donc l'apoptose des thymocytes murins.

Au contraire, GILZ a été décrit comme un inhibiteur de l'apoptose, dans les lymphocytes T.

D'une part, GILZ peut inhiber l'AICD (Activation-Induced Cell Death), une mort induite par la stimulation du récepteur du Lymphocyte T (TCR), et pour laquelle la présence de l'IL-2 et du récepteur de mort Fas est requise. La surexpression de GILZ dans des clones d'hybridome T murins 3DO les rend résistants à l'apoptose induite par l'activation par un anticorps anti-CD3 dirigé contre le TCR (D'Adamio *et al.*, 1997). GILZ est, en outre, capable de diminuer la production de l'IL-2 et celle de la chaîne α de son récepteur en inhibant l'activité des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B (Ayroldi *et al.*, 2001; Mittelstadt and Ashwell 2001). Mittelstadt et collaborateurs ont aussi montré que GILZ, dans les lymphocytes T Jurkat, était capable de réguler négativement l'expression de FasL en inhibant sa transcription (Mittelstadt and Ashwell 2001) (figure 10).

D'autre part, GILZ peut retarder l'entrée en apoptose de lymphocytes T déprivés en facteurs de croissance. Au sein du laboratoire, nous avons montré que l'induction de GILZ dans les CTLL-2 suite à la déprivation en IL-2, permettait de diminuer l'expression de la

protéine BIM, et de ralentir l'entrée en apoptose. GILZ inhibe en effet l'activité transcriptionnelle de FOXO3, responsable de l'induction de BIM (Asselin-Labat *et al.*, 2004) (figure 10).

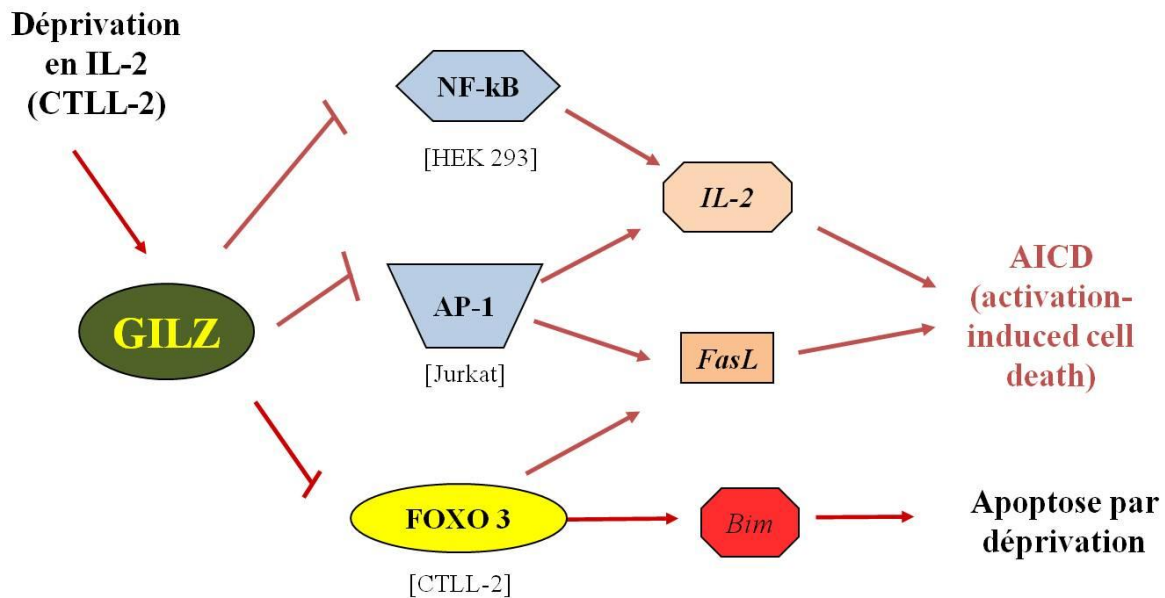


Figure 10. Représentation schématique des mécanismes mis en jeu par GILZ pour inhiber l'apoptose des lymphocytes T.

v. Autres fonctions décrites

Différentes fonctions de GILZ ont par ailleurs été rapportées dans des tissus autres que le tissu hématopoïétique.

GILZ, dont l'expression est induite par les glucocorticoïdes dans les myoblastes primaires murins et dans la lignée cellulaire de myoblastes C2C12, retarde la myogénèse de ces cellules (Bruscoli *et al.*, 2010). GILZ est capable d'interagir avec le facteur de transcription MyoD, ainsi qu'avec HDAC1 (Histone deacetylase 1) sur le promoteur de la *myogénine*, et donc de diminuer l'expression de la Myogénine (Bruscoli *et al.*, 2010). GILZ pourrait ainsi médier l'effet inhibiteur de la myogénèse des glucocorticoïdes (Bruscoli *et al.*, 2010).

GILZ est aussi capable d'inhiber l'adipogénèse des cellules mésenchymales, alors que les glucocorticoïdes induisent la différenciation des cellules pré-adipocytaires en adipocytes.

En effet, GILZ se lie à un site C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) présent sur le promoteur de *ppary2*, inhibant ainsi sa transcription (Shi *et al.*, 2003).

Enfin, GILZ régule le transport du sodium dans les cellules épithéliales rénales. D'une part, la régulation positive de l'expression de GILZ est corrélée à l'augmentation de l'expression de la sous-unité α du transporteur épithélial du sodium (ENaC) (Robert-Nicoud *et al.*, 2001). D'autre part, GILZ inhibe l'activité de la kinase ERK, ce qui par conséquent, stimule le transporteur du sodium (Soundararajan *et al.*, 2005).

Les diverses fonctions de GILZ sont résumées sur le schéma ci-dessous (figure 11).

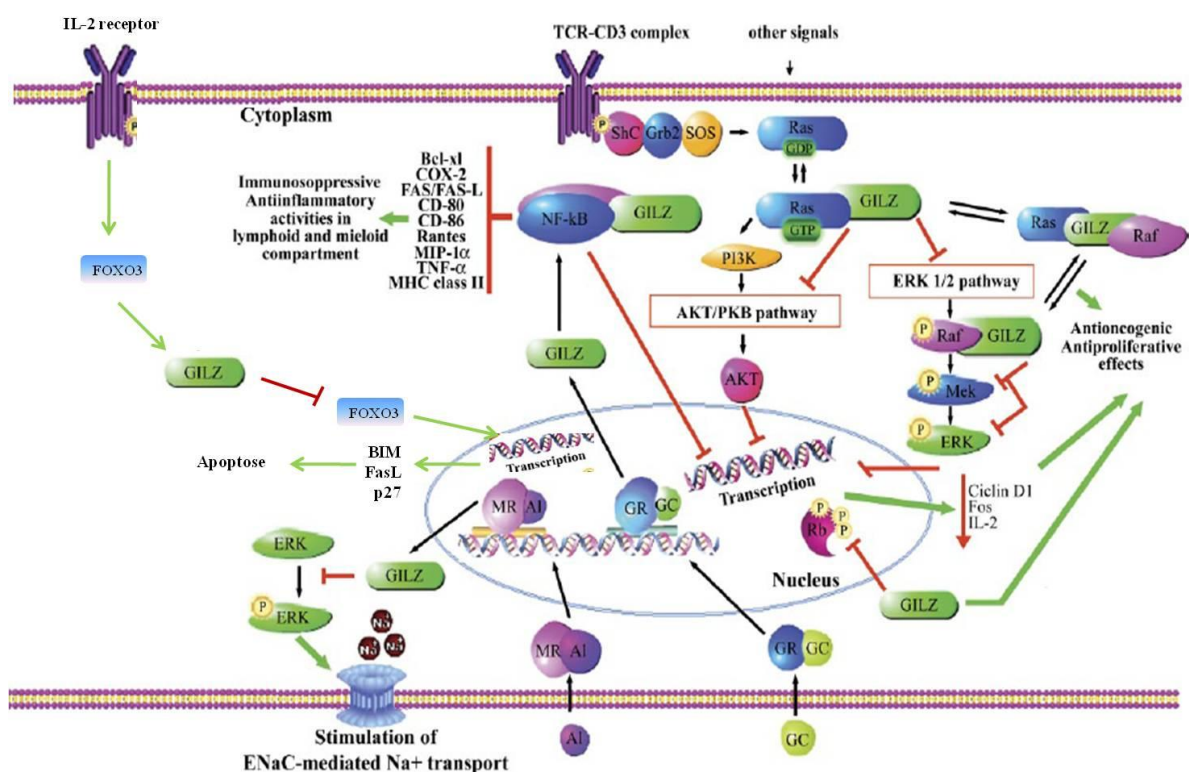


Figure 11. Représentation schématique de certaines fonctions de GILZ. La régulation des protéines médiant son activité anti-inflammatoire, son pouvoir immunosuppresseur, et la stimulation du transporteur ENaC. MR : mineral corticoid receptor; Al: aldosterone; GC: glucocorticoid; GR : glucocorticoid receptor; ShC, et Grb2 : adaptor proteins; SOS : GTP-exchange factor. Les flèches rouges correspondent à une inhibition et les flèches vertes à une activation. D'après Ayroldi *et al.* et Asselin-Labat *et al.* (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Ayroldi and Riccardi 2009).

4. Autres protéines de la famille TSC-22D

Les autres isoformes de la famille des protéines TSC-22D ont été très peu décrites et caractérisées. Une analyse informatique, dont le but était d'identifier des protéines murines homologues à OSTF-1 (Osmotic Stress Transcription Factor 1), a permis d'identifier neuf isoformes issues des quatre différents gènes (Fiol *et al.*, 2007). Ces neuf isoformes sont exprimées dans les cellules rénales murines (Fiol *et al.*, 2007). Une seconde étude, visant à identifier par la technique de double hybride des protéines interagissant avec TSC-22, décrit les différents gènes *tsc-22d* et les isoformes supplémentaires chez l'homme (Khoury *et al.*, 2008).

a. Isoformes TSC-22D1

Le gène *tsc-22d1* code notamment pour TSC-22, mais également pour d'autres isoformes, issues d'un épissage alternatif. Ainsi, une protéine, de taille supérieure à celle de TSC-22, composée de 1057 acides aminés chez la souris ou de 1073 acides aminés chez l'homme, nommée TSC-22D1-1 est aussi issue de l'épissage alternatif de l'ARNm de *tsc-22d1* (Fiol *et al.*, 2007; Homig-Holzel *et al.*, 2011).

La seconde étude, réalisée par Khoury et collaborateurs, a permis d'identifier deux autres isoformes exprimées chez l'homme, nommées 1 et 2, composées respectivement de 742 et 585 acides aminés (figure 12) (Khoury *et al.*, 2008). Nous les appellerons donc TSC-22D1-3 et TSC-22D1-4, pour compléter la nomenclature de Fiol et collaborateurs (Fiol *et al.*, 2007). Ces protéines, hormis TSC-22 et TSC-22D1-1, ont été très peu décrites.

Une étude récente a montré que l'expression de la protéine TSC-22D1-1, mise en évidence dans les cellules HDF Tig3 à l'état basal, serait régulée négativement dans ces cellules au cours du processus de sénescence. Sa surexpression dans ces mêmes cellules inhiberait la sénescence induite par la surexpression de l'oncogène BRAF^{E600}. La régulation négative de TSC-22D1-1 serait due à sa dégradation par le protéasome (Homig-Holzel *et al.*, 2011). Par ailleurs, cette étude a montré que l'expression des protéines TSC-22 et TSC-22D1-1 était régulée de façon inverse. Ainsi, au cours de la sénescence, l'expression de TSC-22 est régulée positivement (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

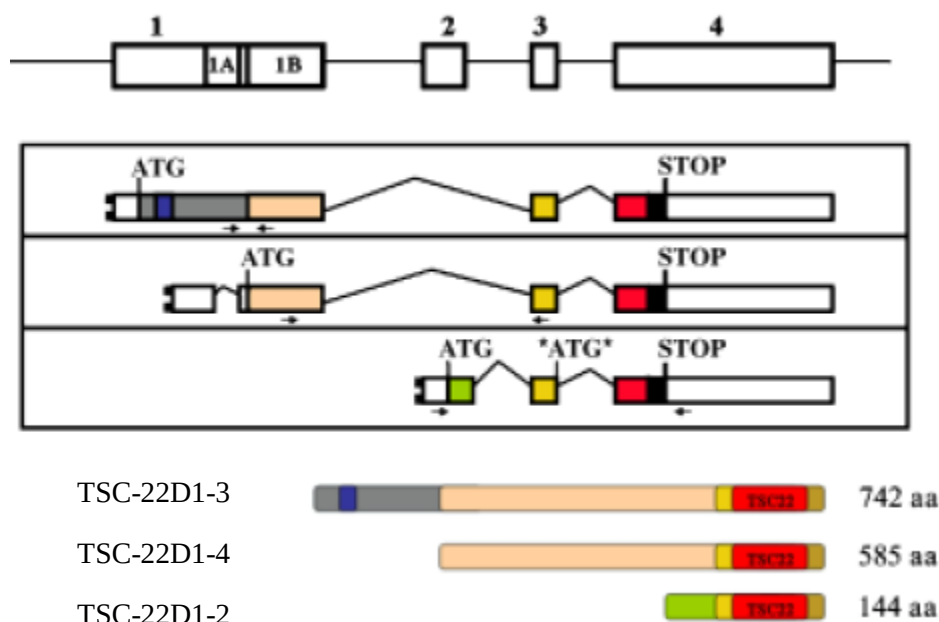


Figure 12. Représentation schématique de l'organisation du gène *tsc-22d1* humain. Dans la partie supérieure, les exons sont représentés et numérotés de 1 à 4. Dans l'encadré, la composition en exons des différents transcrits est schématisée. Les variants d'épissage sont représentés dans la partie inférieure, leur taille est indiquée à droite. Les noms des protéines sont indiqués à gauche, selon la nomenclature de Fiol *et al.* Le domaine conservé TSC-22 est en rouge. D'après Khoury *et al.* et Fiol *et al.* (Fiol *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 2008).

b. Isoformes TSC-22D2

Quatre variants d'épissage du gène *tsc-22d2* ont été décrits chez la souris (Fiol *et al.*, 2007). Les quatre transcrits sont exprimés dans les trois zones du rein (cortex, médulla, et papilla). Dans la lignée de cellules rénales IMCD3, leur expression est induite, par un traitement à l'aldostérone, ou en cas d'hyperosmolarité (addition de NaCl dans le milieu de culture). Cette régulation positive de leur expression est due à une stabilisation de leur ARNm (Fiol *et al.*, 2007). Enfin, l'isoforme TSC-22D2-4, surexprimée transitoirement dans les cellules IMCD3, augmente leur tolérance au stress hyperosmotique (Fiol *et al.*, 2007).

Chez l'homme, trois protéines ont été décrites : elles sont composées respectivement de 780, 124 et 87 acides aminés (Khoury *et al.*, 2008). Elles sont codées par 5 exons différents, comme schématisé sur la figure 13.

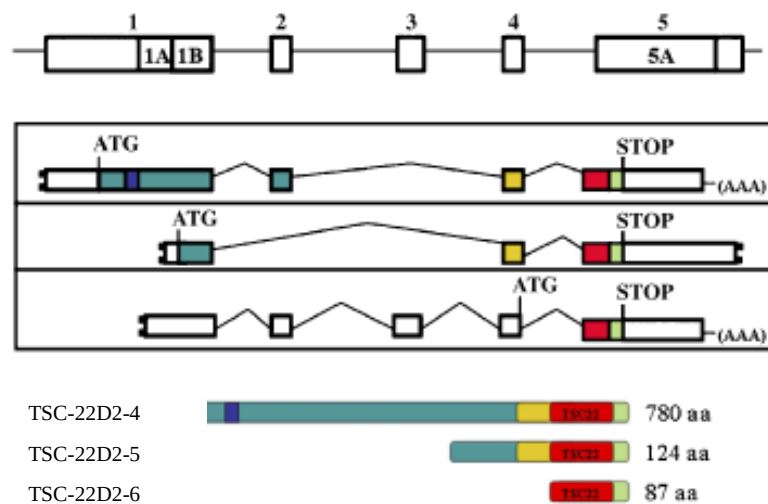


Figure 13. Représentation schématique de l'organisation du gène *tsc-22d2* humain. Dans la partie supérieure, les exons sont représentés et numérotés de 1 à 5. Dans l'encadré, la composition en exons des différents transcrits est schématisée. Les protéines sont représentées dans la partie inférieure, leur taille est indiquée à droite. Les noms des protéines sont indiqués à gauche, selon la nomenclature de Fiol *et al.* Le domaine conservé TSC-22 est en rouge. D'après Khoury *et al.* et Fiol *et al.* (Fiol *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 2008).

c. Isoformes TSC-22D3 : TSC-22D3-1, TSC-22D3-3, TSC-22D3-4 et TSC-22D3-5 (L-GILZ)

Le gène *tsc-22d3* code non seulement pour la protéine GILZ, mais aussi pour trois autres isoformes, identifiées dans les cellules rénales murines (figure 14). Les différentes protéines ont été intitulées par Soundararajan et collaborateurs GILZ 1, GILZ 2, GILZ 3 et GILZ 4, de part leur homologie de séquence avec GILZ (Soundararajan *et al.*, 2007). Cependant, nous allons continuer à désigner ces différents transcrits en utilisant la nomenclature initiée par Fiol *et al.* (Fiol *et al.*, 2007).

Plus récemment, un transcrit de taille supérieure à celle de tous les autres transcrits de *tsc-22d3* décrits a été découvert dans les cellules musculaires murines C2C12 (Bruscoli *et al.*, 2010). Cette protéine a été dénommée L-GILZ pour Long-GILZ.

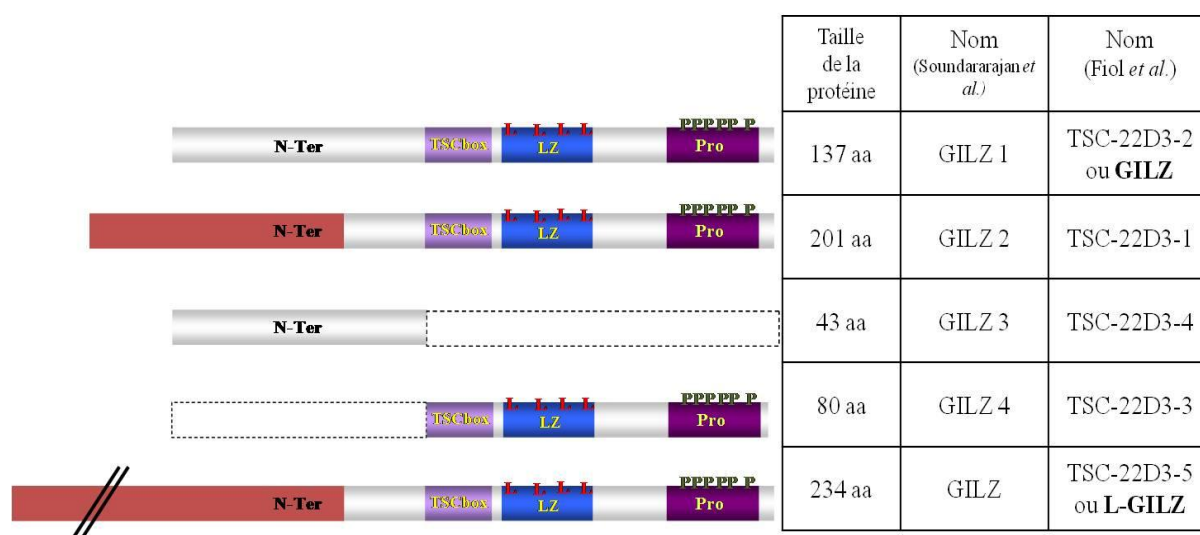


Figure 14. Alignement des différentes protéines issues du gène *tsc-22d3* par rapport à GILZ murin. La protéine GILZ est schématisée en haut de la figure. Les différents domaines TSC-box (TSC22), Leucine Zipper (LZ) et Région riche en Prolines (Pro) sont figurés. Dans le tableau, le nombre des acides aminés (aa) et les noms des isoformes sont indiqués. D'après Soundararajan *et al.* (Soundararajan *et al.*, 2007).

i. Structure des isoformes TSC-22D3

Les isoformes TSC-22D3-1, TSC-22D3-3 et TSC-22D3-5 possèdent toutes les domaines TSC-box, LZ et la région riche en prolines. Elles diffèrent de GILZ dans la partie N-terminale. Ainsi, TSC-22D3-3, composé de 80 acides aminés, correspond à la protéine GILZ déletée de sa partie N-terminale. Les protéines TSC-22D3-1 et TSC-22D3-5 présentent un poids moléculaire supérieur à celui de GILZ, car leurs domaines N-terminaux sont plus longs. Enfin, l'isoforme TSC-22D3-4, qui est la plus courte, ne possède pas de domaine TSC-22, car elle correspond seulement à la portion N-terminale de GILZ (figure 14).

L'existence des différentes protéines s'explique par la présence de six exons et de deux sites d'initiation de la transcription sur le promoteur de *tsc-22d3*. La transcription débutée sur le premier promoteur (P1) induit l'expression de l'isoforme 2, plus longue que GILZ (201 acides aminés). L'activation du second promoteur (P2) est responsable de la transcription de *gilz* et des deux isoformes plus courtes, les isoformes 3 et 4, composées respectivement de 43 et 80 acides aminés (figure 15).

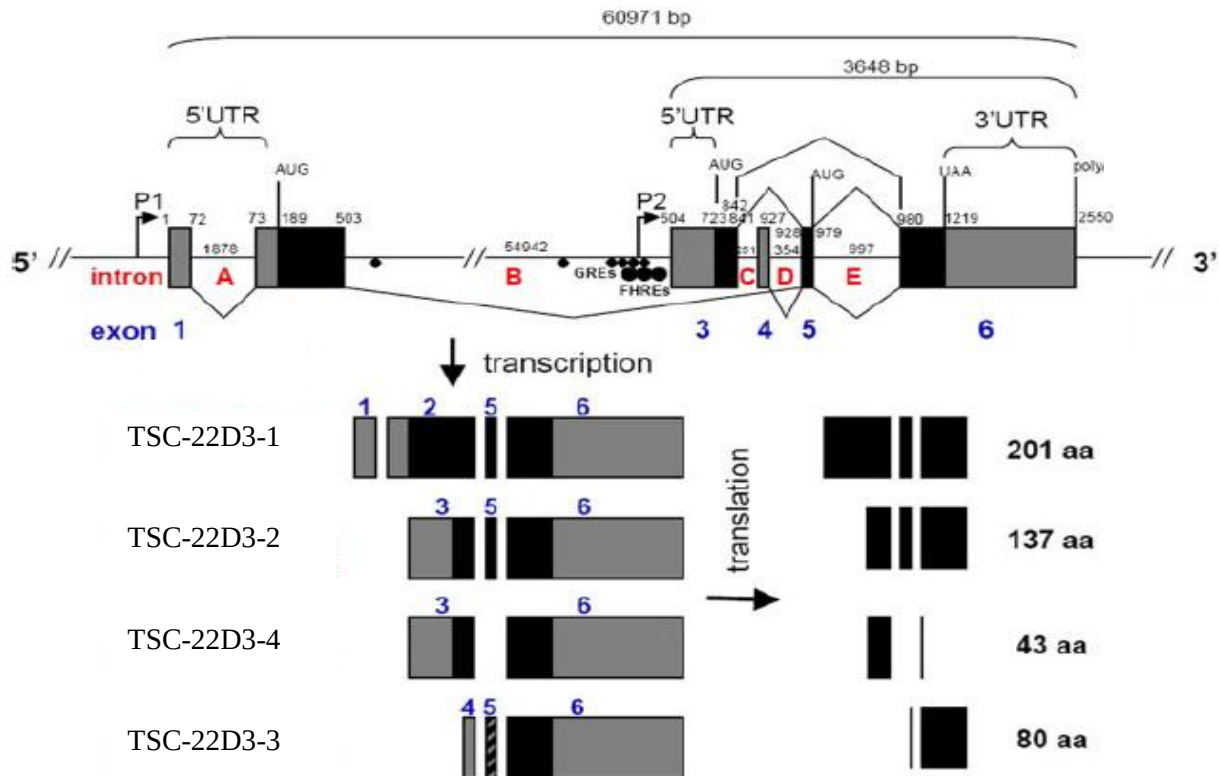


Figure 15. Schéma du promoteur de *tsc-22d3* murin et des ARNm et protéines exprimées. Le promoteur est schématisé dans la partie supérieure dans le sens 5'-3'. Les sites d'initiation de la transcription sont notés P1 et P2. Les introns sont en gris clair et sont nommés par les lettres A à E ; les exons sont en gris foncé et sont numérotés de 1 à 6. GRE : Glucocorticoid Response Element ; FHRE : Forkhead Response Element. Dans la partie inférieure, les ARNm et les protéines sont dessinées. Les noms des protéines sont indiqués à gauche, selon la nomenclature de Fiol *et al.* Le nombre des acides aminés (aa) des protéines est indiqué à droite. D'après Soundararajan *et al.* et Fiol *et al.* (Fiol *et al.*, 2007; Soundararajan *et al.*, 2007).

L'ARNm de *l-gilz*, composé de 705 paires de bases, provient d'un épissage alternatif de *tsc-22d3*. Un codon d'initiation de la traduction, dont la séquence n'est pas canonique (CUG), a été identifié au sein d'une séquence très proche d'une séquence Kozak (figure 16) (Bruscoli *et al.*, 2010). Cette séquence est en amont du site de la traduction identifié par Soundararajan et collaborateurs (Soundararajan *et al.*, 2007).

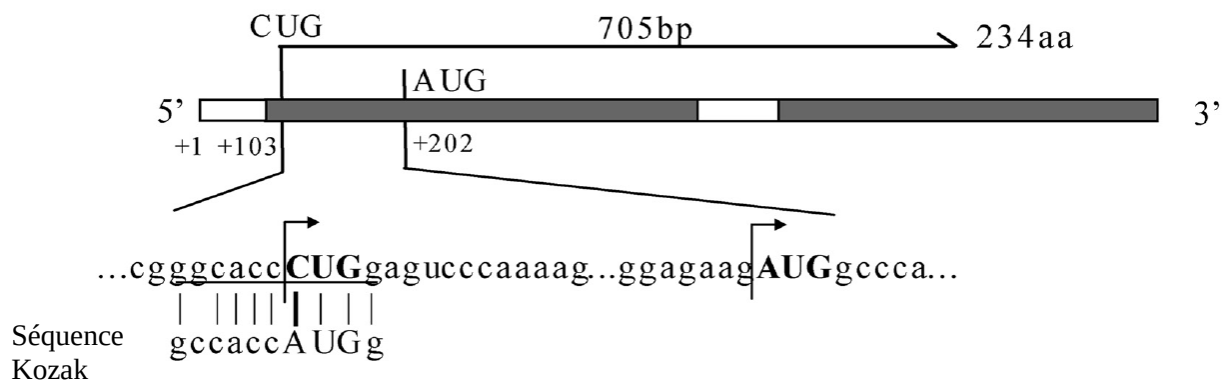


Figure 16. Représentation du site d'initiation de la traduction de *l-gilz* murin. Le codon d'initiation non canonique CUG, ainsi que la séquence Kozak à laquelle il est lié, sont représentés. De Bruscoli *et al.* (Bruscoli *et al.*, 2010).

ii. Fonctions des isoformes TSC-22D3

- Fonctions des isoformes TSC-22D3-1, TSC-22D3-3 et TSC-22D3-4

Les transcrits de *tsc-22d3* sont tous induits par l'aldostérone dans les cellules rénales murines (Fiol *et al.*, 2007). Les protéines TSC-22D3-1 et TSC-22D3-2 seraient également détectables par Western-Blot dans différents tissus de rat et de souris, tels que les poumons, la rate et le cœur (Soundararajan *et al.*, 2007).

Une étude réalisée en surexprimant dans les cellules épithéliales rénales les différentes isoformes codées par le gène *tsc-22d3* a montré qu'elles avaient des fonctions différentes de celles de GILZ (Soundararajan *et al.*, 2007). Ainsi, l'interaction entre TSC-22D3-1, possédant un domaine N-terminal de taille supérieure à celle de GILZ, et Raf-1 est moins importante que celle de GILZ avec Raf-1. La prolifération des cellules HEK293 transfectées avec un vecteur d'expression pour TSC-22D3-1 ou GILZ est, en outre, moins inhibée en présence de TSC-22D3-1 qu'en présence de GILZ. L'isoforme TSC-22D3-4, ne possédant ni domaine C-terminal, ni TSC-box, ne peut interagir avec Raf-1 dans les cellules rénales, mais est capable d'inhiber la phosphorylation de ERK quand il est surexprimé dans les cellules HEK293. L'isoforme TSC-22D3-3, sans domaine N-terminal, ne peut interagir avec Raf-1, et ne peut inhiber la phosphorylation de ERK, mais elle aurait un pouvoir antiprolifératif plus important que celui de GILZ. Le mécanisme sous-jacent n'a pas été explicité (Soundararajan *et al.*, 2007).

- Fonction de L-GILZ

La protéine L-GILZ est retrouvée dans les muscles et dans la rate des souris adultes. Son expression est induite par les glucocorticoïdes dans les myoblastes primaires murins et dans la lignée cellulaire C2C12 différenciée en myoblastes (Bruscoli *et al.*, 2010).

L-GILZ, dont l'expression est induite au cours de la différenciation des cellules en myotubes, inhibe la myogénèse. En effet, L-GILZ transloque dans le noyau au cours de ce processus : il est capable de diminuer l'activité du facteur de transcription MyoD et donc l'expression de ses gènes cibles, tels que la *myogénine*. Dans ce cas, L-GILZ interagit avec MyoD, provoquant l'altération de la fonction de l'Histone Déacétylase 1 (HDAC1) et par conséquent, la modification de l'acétylation des histones du promoteur de la *myogénine* (Bruscoli *et al.*, 2010).

Dans ces cellules, les protéines L-GILZ et GILZ surexprimées possèdent les mêmes fonctions : elles sont toutes deux capables d'interagir avec MyoD et donc d'inhiber la myogénèse (Bruscoli *et al.*, 2010).

d. Isoformes TSC-22D4

i. Structure des isoformes

Le gène *tsc-22d4* code pour trois isoformes, identifiées chez l'homme, issues d'un épissage alternatif. Deux isoformes de petite taille, TSC-22D4-2 et TSC-22D4-3, respectivement de 310 et 195 acides aminés, sont exprimées. La protéine TSC-22D4-2 ne contient pas de domaine TSC-22 (figure 17). La fonction de ces deux isoformes n'a pas été recherchée.

La troisième isoforme, TSC-22D4-1, présentant le plus grand domaine N-terminal, également nommée THG-1 (TSC-22 Homologous Gene-1), a été caractérisée plus précisément (figure 17).

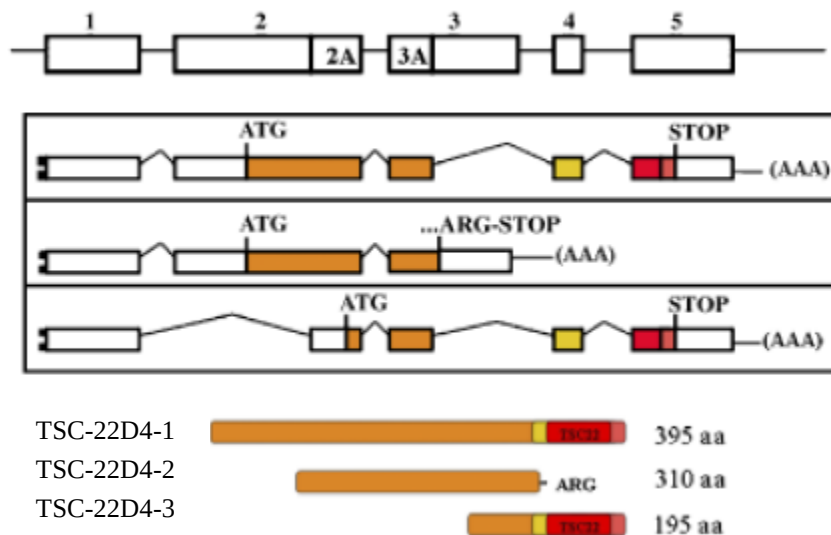


Figure 17. Représentation schématique de l'organisation du gène *tsc-22d4* humain. Dans la partie supérieure, les exons sont représentés et numérotés de 1 à 5. Dans l'encadré, la composition en exons des différents transcrits est schématisée. Les variants d'épissage sont représentés dans la partie inférieure, leur taille est indiquée à droite. Les noms des protéines sont indiqués à gauche, selon la nomenclature de *Fiol et al.* Le domaine conservé TSC-22 est en rouge. D'après *Khoury et al.* et *Fiol et al.* (*Fiol et al.*, 2007; *Khoury et al.*, 2008).

ii. Isoforme TSC-22D4-1 : TSC-22 Homologous Gene-1 (THG-1)

La protéine THG-1 a été identifiée en 1999 comme une protéine interagissant avec la protéine TSC-22. Elle a donc été nommée TSC-22 Homologous Gene-1 (THG-1) (*Kester et al.*, 1999). La protéine murine a été caractérisée en 2001 dans la glande pituitaire en développement, d'où son nom THG-1 pit (*Fiorenza et al.*, 2001).

• Structure

La protéine humaine THG-1 est constituée de 395 acides aminés et la protéine murine est composée de 387 acides aminés. Leurs séquences sont identiques à 79 % (figure 18) (*Fiorenza et al.*, 2001). Le poids moléculaire de la protéine humaine est d'environ 41 kDa.

m-THG-1	MSGGKKKSSFQITSVTDDYEGPGSPGASDSPVPPALAGPPPRLPNGDPNPDGGRGTPRN	60
	+ +	
h-THG-1	MSGGKKKSSFQITSVTDDYEGPGSPGASDPPTPQPPTGPPRLPNGEPSDPGKGKGTPRN	60
	GSPPPGAPASRFRVVKLPQGLGEPYRRGRWTCVDVYKRDLEPPSFGRLLLEGIRGASGGTG	120
	+ +	
	GSPPPGAPSSRFRVVKLPHGLGEPYRRGRWTCVDVYERDLEPHSFGLLEGIRGASGGAG	120
	GRSLDSRLELASLGISTPIQPGLSQGPTSWLRPPPTSPGPQARSFTGGLGQLAGPGKAK	180
	+	
	GRSLDSRLELASLGLGAPTPPSGLSQGPTSWLRPPPTSPGPQARSFTGGLGQLVVPKAK	180
	VETPPLSASPPQQRPPGPGTGDQAQT-----LPSLRVEVESGGSAARNPSTVTEKRWSS	234
	+	
	AEKPPLSASSPQQRPPPEPETGESAGTSRAATPLPSLRVEAEAGSGGARTPPLSRRKAVDM	240
	SAEDGVSCSSGDRKGTSTDSRPNSPALYF--DASLVHKSPDPFGAAAAQSLSLARSMLAISGH	292
	+ + +	
	RLRMELGAPEEMQVPPPLDSRPSSPALYFTHDASLVHKSPDPFGAVAAQKFSLAHSMLAISGH	300
	LDSDDDSGSGSLVGIDNKIEQAMDLVKSHLMFAVREEVEVLKEQIRDLAERNAALEQENG	352
	+	
	LDSDDDSGSGSLVGIDNKIEQAMDLVKSHLMFAVREEVEVLKEQIRELAERKRALEQENG	360
	LLRALASPEQLAQLPSSGLPRLGPSAPNGPSI	387
	+	
	LLRALASPEQLAQLPSSGVPRLGPPAPNGPSV	395

Figure 18. Alignement des séquences murine (m-THG-1) et humaine (h-THG-1) de la protéine THG-1. Les traits verticaux correspondent aux acides aminés identiques.

Les domaines TSC-box et Leucine Zipper permettent à THG-1 d'interagir avec TSC-22 (Kester *et al.*, 1999). Cette interaction est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de TSC-22. Le domaine N-terminal de THG-1 (acides aminés 1 à 310) est considéré comme un domaine répresseur (RD) car il diminue les capacités d'interaction avec TSC-22 (Kester *et al.*, 1999). Dans ces conditions de surexpression transitoire dans les cellules COS-1, THG-1 est localisée dans le noyau (Kester *et al.*, 1999).

- Expression

La protéine THG-1 est exprimée dans l'hypophyse, où elle pourrait jouer un rôle dans les étapes précoces du développement de cette glande. Son expression est effectivement induite par le facteur de transcription Lhx3, LIM-homeobox 3 (Fiorenza *et al.*, 2001).

D'autre part, la protéine THG-1 est présente dans le système nerveux murin (Canterini

et al., 2005; Canterini *et al.*, 2009). Des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de montrer que l'expression de *thg-1 pit* est restreinte à certaines zones du cerveau de l'embryon de la souris; il s'agit des régions dans lesquelles les précurseurs des cellules de la couche granulaire du cervelet trouvent leur origine (Canterini *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que THG-1 serait nécessaire au développement embryonnaire de la souris.

Enfin, l'ARNm de *thg-1 pit* est également exprimé dans différentes zones du cerveau de la souris adulte, notamment dans les cellules de Purkinje et les cellules de la couche granulaire du cervelet (Canterini *et al.*, 2005).

Une récente étude a montré que la protéine THG-1 était exprimée dans les fibroblastes diploïdes humains HDF et dans les mélanocytes humains, et que son expression n'était pas modifiée au cours de la sénescence de ces cellules (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

- Fonction de THG-1

La transcription de *thg-1 pit* dans les cellules de la couche granulaire du cervelet murin est induite spécifiquement par le TGF- β et cette transcription est majorée quand les cellules sont cultivées dans des conditions pro-apoptotiques, c'est-à-dire en faible quantité de K⁺ (Canterini *et al.*, 2009). La présence de THG-1 PIT dans les cellules augmente leur apoptose due à la privation en K⁺ (Canterini *et al.*, 2009).

De plus, la protéine THG-1 PIT, localisée dans le cytoplasme, migre dans le noyau au cours de l'apoptose. Son entrée dans le noyau coïncide avec celle de la protéine mitochondriale AIF (Apoptosis-Inducing Factor). Ces résultats suggèrent donc que THG-1 PIT serait impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules de la couche granulaire du cervelet chez la souris.

e. Bun, les protéines homologues de TSC-22 chez la drosophile

Un homologue de TSC-22 a été découvert en 1995 chez *Drosophila melanogaster*, et fut nommé shortsighted (*shs*). Le gène *shs* code pour une protéine cytoplasmique exprimée dans l'œil et impliquée dans son développement (Treisman *et al.*, 1995). Ce gène a ensuite été renommé *Bunched*, et les protéines sont appelées Bun (Dobens *et al.*, 1997). Le gène *bunched* est le seul de la famille TSC-22D présent chez la drosophile (Wu *et al.*, 2008). Plusieurs

isoformes de Bun existent (BunA à BunF). Ces protéines sont identiques dans leur région C-terminale (figure 19). L'homologie de séquence de *bunched* avec *tsc-22* dans le domaine commun à la famille (LZ et TSC-box) est de 68% (Dobens *et al.*, 1997).



Figure 19. Représentation schématique des différentes isoformes Bun. La portion rouge est le domaine commun à toutes ces protéines. Les domaines issus d'exons uniques sont représentés de différentes couleurs. De Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2008).

Bun est impliqué dans le processus d'ovogénèse (Dobens *et al.*, 1997). La surexpression d'un allèle dominant négatif de *bun*, induisant uniquement le domaine conservé TSC-22, bloque le développement correct des cellules folliculaires de la drosophile (Ash *et al.*, 2007). Enfin, les protéines Bun participent à la croissance cellulaire et à la prolifération des cellules folliculaires ovariennes (Wu *et al.*, 2008).

La délétion de BunA, l'isoforme de taille la plus importante, diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules folliculaires, alors que la surexpression des petites isoformes BunB et BunC antagonise les fonctions de BunA (Gluderer *et al.*, 2008).

5. Fonctions du domaine TSC-22

a. Rôles du domaine TSC-22

Le domaine TSC-22 est composé de la TSC-box (Tuberous Sclerosis Complex Box) et du domaine Leucine Zipper.

Khoury et collaborateurs ont démontré que ce domaine TSC-22, associé à 29 autres acides aminés de la région C-terminale de la protéine TSC-22, serait capable d'inhiber l'apoptose de levures traitées avec de l'eau oxygénée (Khoury *et al.*, 2008). Ces auteurs suggèrent que ce domaine, très conservé entre les espèces, pourrait ainsi être responsable de la régulation de l'apoptose des cellules de mammifères par les protéines TSC-22D.

Le rôle du domaine TSC-box a été étudié en utilisant l'homologue de la protéine TSC-22 exprimé chez l'amphibien *Xenopus laevis*, dénommé XTSC-22. Il est intéressant de noter que la TSC-box de XTSC-22 est identique à celle de TSC-22 murin et humain (figure 20).

xenopus	1	-----MDLGVCQLRHFSISFLSALLGTDSPAVTVDS	SSASGASVVAIDNKIEQAMD	50	
X. tropicalis EST	1	-----MDLGVCQLRHFSISFLSALLGTDSPAVTVDS	SSASGASVVAIDNKIEQAMD	50	
mouse	1	MKSQWCRPVAMD	LGWVCQLRHFSISFLSLLGTENASVRLDMS	SSASGASVVAIDNKIEQAMD	59
human	1	MKSQWCRPVAMD	LGWVCQLRHFSISFLSLLGTENASVRLDMS	SSASGASVVAIDNKIEQAMD	60
xenopus	51	LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENNLLKTLASPEQLAQFQAQLQAGSPP		110	
X. tropicalis EST	51	LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENNLLKTLASPEQLAQFQAQLQAGSPP		110	
mouse	60	LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENNLLKTLASPEQLAQFQAQLQAGSPP		119	
human	61	LVKSHLMYAVREEVEVLKEQIKELIEKNSQLEQENNLLKTLASPEQLAQFQAQLQAGSPP		120	
xenopus	111	SSSS-CSQPPGSTPAPAQPIQSTGPSA		137	
X. tropicalis EST	111	SSSSTCSQPPGSTAAPAQPTPQSTGPSA		138	
mouse	120	ATT---QPQGITQPPAQPASQGSSTA		143	
human	121	ATT---QPQGITQPPAQPASQGSSTA		144	

TSC-box

Leucine Zipper

Figure 20. Alignement de XTSC-22 (de *Xenopus laevis* et de *Xenopus tropicalis*) avec les protéines TSC-22 murine et humaine. Les lettres surlignées en noir correspondent aux acides aminés identiques chez *Xenopus* et les mammifères. La TSC-box est encadrée en rose et le domaine leucine zipper en bleu. D'après Hashiguchi *et al.* (Hashiguchi *et al.*, 2004).

XTSC-22 inhibe la prolifération cellulaire, en retardant la progression dans le cycle cellulaire (Hashiguchi *et al.*, 2004). L'utilisation de différents mutants de délétion de TSC-22 a permis de montrer que la TSC-box est indispensable à l'activité de XTSC-22. Ainsi, en l'absence de la TSC-box, XTSC-22 n'est plus retrouvé uniquement dans le noyau, mais dans tous les compartiments de la cellule, et ne peut plus exercer son activité anti-proliférative (Hashiguchi *et al.*, 2007).

La TSC-box et le domaine LZ, sont également responsables de l'activité transcriptionnelle des protéines de la famille TSC-22D. En effet, des tests d'activité transcriptionnelle réalisés dans différents types cellulaires, avec la protéine TSC-22 fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, montrent que le domaine TSC-22 induit l'activité transcriptionnelle d'un plasmide rapporteur contenant les séquences consensus GAL (Kester *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2003). Les domaines N- et C-terminaux des protéines TSC-22 et THG-1 sont des domaines répresseurs de l'activité transcriptionnelle (Kester *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2003).

b. Interactions entre protéines

Les domaines TSC-box et Leucine Zipper, très conservés parmi les protéines de la famille TSC-22D, permettent à ces protéines de s'homo-dimériser ou de s'hétéro-dimériser.

D'une part, l'homodimérisation de GILZ a été décrite par Di Marco et collaborateurs, comme étant indispensable à son activité (Di Marco *et al.*, 2007). Ainsi, la mutation des quatre leucines présentes dans le domaine LZ empêche sa dimérisation et inhibe alors l'interaction de GILZ avec le facteur de transcription NF- κ B *via* la région riche en prolines (Di Marco *et al.*, 2007).

Les protéines TSC-22 et THG-1 ont également la capacité de s'homodimériser via les domaines TSC-box et LZ (Kester *et al.*, 1999). La mutation de deux leucines du domaine LZ de TSC-22 (leucines 91 et 97) invalide la dimérisation de TSC-22 (Gupta *et al.*, 2003).

D'autre part, seule l'interaction entre deux protéines TSC-22D, TSC-22 et THG-1, a été bien démontrée. Des expériences de GST-Pull Down dans les cellules COS-1 ont permis de mettre en évidence que TSC-22 et THG-1 peuvent interagir *via* ces domaines (Kester *et al.*, 1999). L'interaction entre TSC-22 et THG-1 a également été décrite dans la lignée HDF Tig3 surexprimant BRAF^{E600} (Homig-Holzel *et al.*, 2011). Dans ces cellules, THG-1 peut aussi interagir avec l'isoforme TSC-22D1-1, mais pas avec la forme tronquée de TSC-22 appelée TSC-22^{86aa}, dans laquelle la TSC-box n'est pas complète, suggérant le rôle important de la TSC-box (Homig-Holzel *et al.*, 2011).

Les domaines TSC-box et leucine zipper sont également impliqués dans l'interaction des protéines TSC-22 et GILZ avec des protéines n'appartenant pas à la famille TSC-22D.

Ainsi, le domaine TSC-22 est impliqué dans l'interaction de la protéine TSC-22 avec la Fortiline, une protéine anti-apoptotique, dans les cellules SKOV-3 (Lee *et al.*, 2008). Cette interaction induit la dégradation de TSC-22 (Lee *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le domaine TSC-box de GILZ est impliqué dans l'interaction avec la petite protéine G, Ras, dans les hybridomes 3DO ou dans des thymocytes murins traités avec de la dexaméthasone (Ayroldi *et al.*, 2007). En présence de taux élevés de la protéine Ras, GILZ peut former un complexe ternaire avec Ras et Raf dans les cellules COS-7; Raf interagissant avec GILZ *via* le domaine N-terminal (Ayroldi *et al.*, 2007; Beaulieu and Morand 2011).

II. Régulation de l'homéostasie des lymphocytes T

La réponse immunitaire adaptative implique différents types cellulaires, parmi lesquels les lymphocytes T (LT). En effet, ils sont capables de reconnaître un antigène, présenté par une cellule présentatrice d'antigène, d'induire la production des molécules responsables à la fois de la prolifération de ces LT et de la régulation de l'activité des différentes sous-populations de LT. En fin de réponse immunitaire, les LT effecteurs vont disparaître, et des LT mémoires vont être produits. Les différentes phases de la réponse immunitaire adaptative sont schématisées ci-dessous (figure 21).

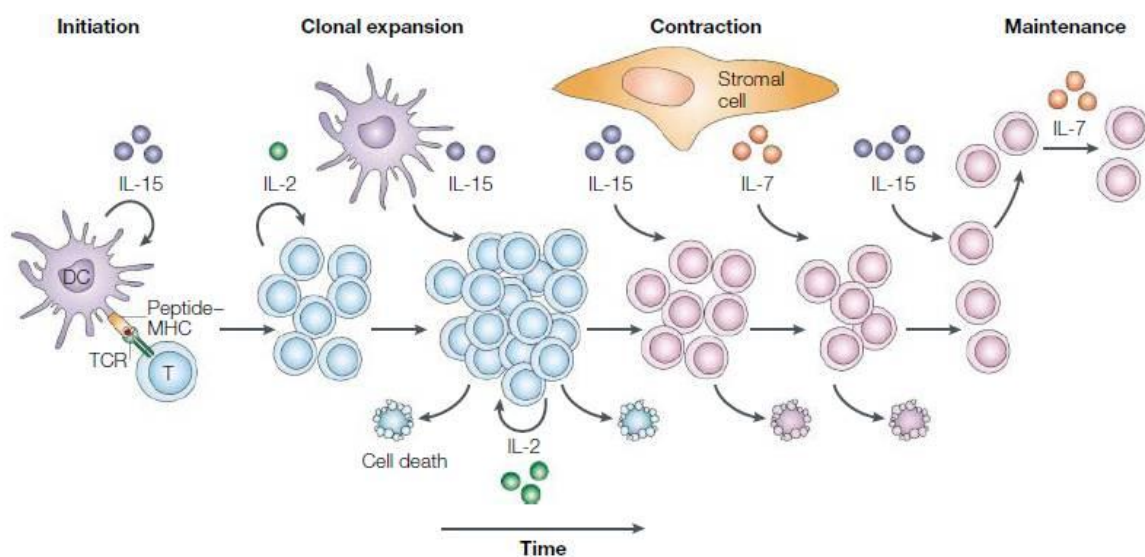


Figure 21. Les différentes phases de la réponse immunitaire. Les interleukines (IL-2, IL-7, et IL-15) peuvent accroître la prolifération des lymphocytes T ou leur survie aux différentes étapes. De Schluns *et al.* (Schluns and Lefrancois 2003).

1. Activation des lymphocytes T et expansion clonale

a. Initiation de la réponse immunitaire

Une cellule présentatrice d'antigène (CPA), qui peut être une cellule dendritique (CD), un monocyte ou un macrophage, ou encore un lymphocyte B dans le cas des réponses immunes secondaires, expose à sa surface un peptide issu de l'antigène, lié à une molécule du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Le peptide est reconnu par le récepteur de l'antigène d'un lymphocyte T naïf (TCR). Le récepteur de l'antigène du LT est constitué de deux chaînes polypeptidiques, α et β , couplées de façon non covalente à des molécules hétérodimériques, le complexe CD3, présentant des domaines ITAMs (Immunoreceptor

Tyrosine-based Activation Motifs) intracellulaires. Le complexe CD3 est souvent constitué des chaînes $\delta\epsilon$ et $\gamma\epsilon$, ainsi que de deux chaînes ζ , qui se retrouvent localisées au sein du complexe TCR-CD3 suite à la liaison de l'antigène au TCR.

L'interaction entre le LT et la CPA est le premier signal nécessaire à l'activation du LT naïf. Cette interaction va être suivie de la liaison entre le récepteur CD11a/CD18 ou LFA1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) présent sur le LT et ICAM1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1) également appelé CD54, exprimé à la surface de la CPA. Les régions cellulaires à proximité du TCR du LT et du complexe peptide antigénique/CMH vont constituer la synapse immunologique (Friedl *et al.*, 2005).

Dans les quelques secondes suivant l'interaction, des molécules intracellulaires sont activées par phosphorylation et recrutées près de la synapse : la chaîne CD3 ζ , la tyrosine kinase LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) et la kinase ZAP70 (ζ -chain associated protein kinase of 70kDa), ainsi que la kinase PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase). Une des cibles de ZAP70 est la molécule adaptatrice LAT (Linker for Activation of T cells), relocalisée à la membrane suite à la liaison du TCR. LAT contient des motifs ITAMs lui permettant de se lier à des domaines SH2 (Src Homology 2) de molécules effectrices. L'activation de la PI3K induit l'augmentation des taux de PIP3 ou PtdIns(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), associés à la membrane. Les PIP3 recrutent des protéines contenant des domaines Pleckstrin-Homology (PH), parmi lesquelles WAVE (Wiscott-Aldrich-syndrome-protein-family verprolin homologous protein), un adaptateur du cytosquelette, et des kinases, telles que Akt/PKB (Protein Kinase B). Les petites GTPases RAC1 et RHO-A (Ras Homologue-A) sont ensuite activées, régulant alors la dynamique des filaments d'actine au sein de la synapse immunologique (figure 22) (Chandok and Farber 2004; Tait and Green 2010).

En même temps, d'autres molécules, telles que le TCR, le CD4 ou le récepteur CD28, sont transportées jusqu'à la plateforme de la synapse immunologique en cours de formation. Ces déplacements sont possibles grâce au recrutement des molécules au sein des radeaux lipidiques ou au recrutement des vésicules d'endocytose qui sont transportées le long des microtubules (figure 22). La protéine CD4, exprimée sur les lymphocytes T reconnaissant les CPA présentant un CMH de classe II, se localise à proximité du complexe TCR-CD3 ; elle augmente ainsi l'avidité du TCR pour le complexe peptide antigénique/CMH II. Le récepteur CD28, quant à lui, interagit avec les molécules CD80 et CD86 de la CPA, respectivement

appelées B7.1 et B7.2. CD28 est considéré comme une molécule indispensable à l'activation complète du LT (Friedl *et al.*, 2005). Récemment, il a été démontré que CD28 induirait en outre le recrutement du complexe β -arrestin-phosphodiesterase 4 (PDE4), responsable de la régulation négative des taux d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique), élevés suite à l'activation du TCR (Bjorgo and Tasken 2010).

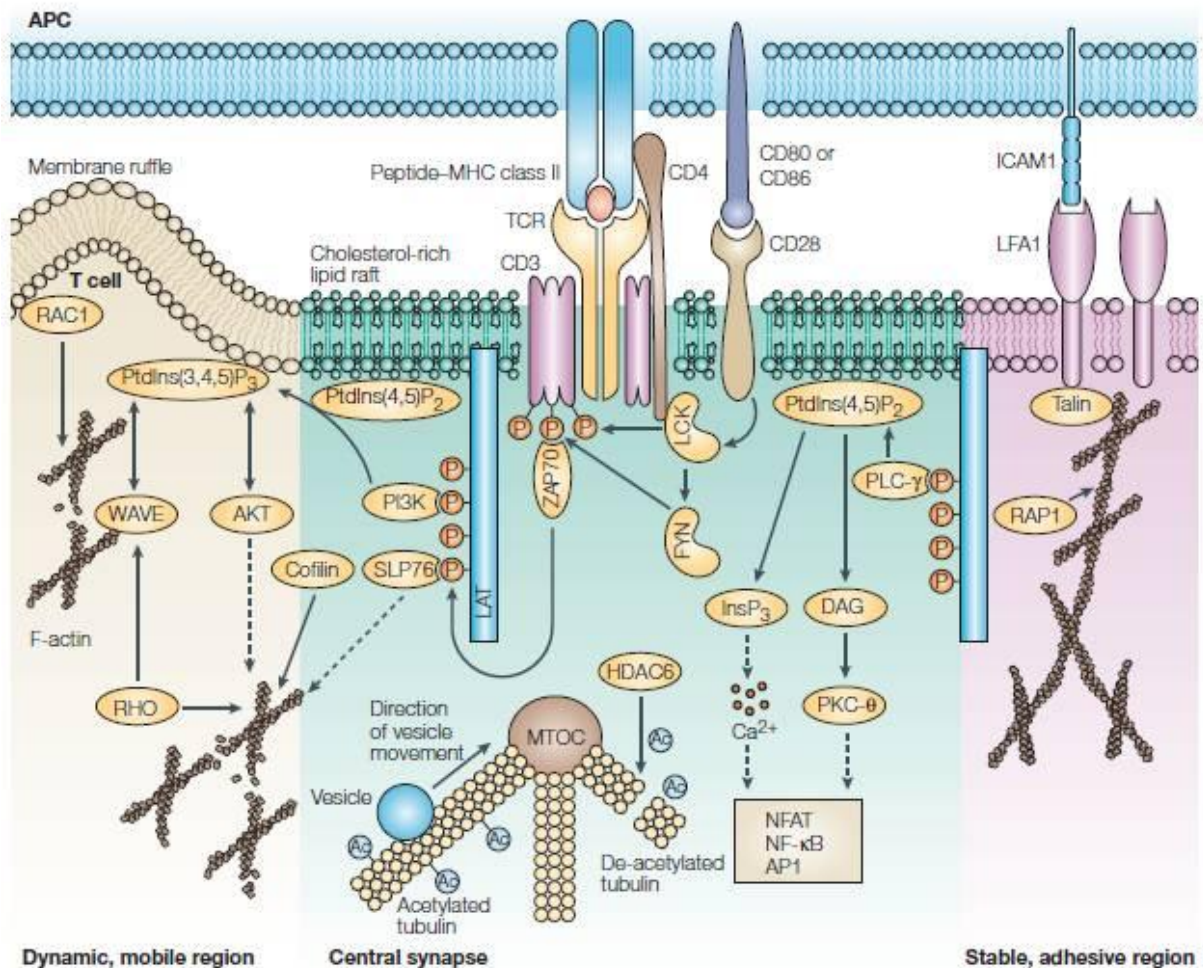


Figure 22. Organisation moléculaire de la plateforme du lymphocyte T de la synapse immunologique. De Friedl *et al.* (Friedl *et al.*, 2005).

Les molécules à la surface du LT vont se répartir selon différentes zones. Au centre de l'interaction, se trouvent les complexes TCR et CD3, associés à la kinase PKC- θ , constituant ainsi la zone cSMAC (central Supramolecular Activation Cluster). CD4 est retrouvé près de la

chaîne CD3 ζ ; CD28, CD2, et CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4) sont également localisés dans cette zone (figure 23). La zone périphérique (pSMAC) comprend les molécules LFA1, et la zone distale (dSMAC) est riche en récepteurs CD45 (Friedl *et al.*, 2005).

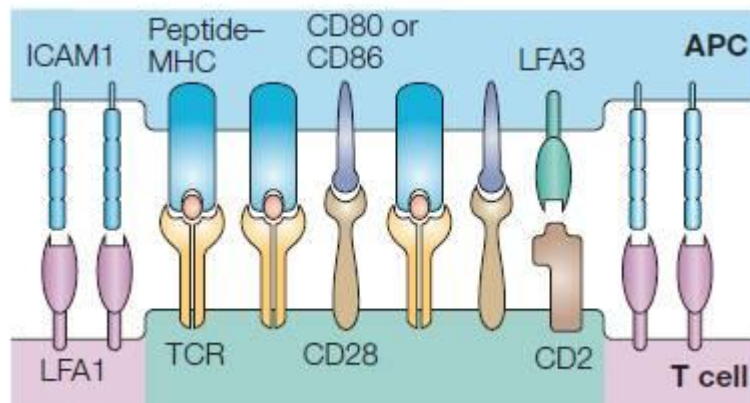


Figure 23. Schéma de la synapse immunologique entre un LT (T cell) et une cellule présentatrice d'antigène (APC). Les récepteurs et les ligands exprimés par chaque cellule sont schématisés. De Friedl *et al.* (Friedl *et al.*, 2005).

Suite à une interaction soutenue entre le LT et la CPA, le TCR est internalisé dans des vésicules cytoplasmiques à partir du cSMAC. Cette étape permettrait d'initier la séparation du LT et de la CPA. Les molécules d'adhésion, telles que LFA1, seraient régulées négativement, ou réparties différemment à la surface de la cellule ; l'expression de chimiokines et de récepteurs de chimiokines pourrait être augmentée afin de diminuer l'interaction et d'initier la migration des cellules.

L'activation complète d'un LT naïf requiert différents signaux. Le premier signal est transmis par l'interaction du TCR avec le complexe peptide antigénique/CMH II. Le deuxième signal est dû à la liaison des molécules de co-stimulation, telles que le CD28, et la stimulation des cellules par des cytokines telles que l'interleukine-2 (IL-2) est le troisième signal (Boyman *et al.*, 2009).

Suite à l'interaction TCR-antigène, un certain nombre de voies de signalisation sont activées : Akt/PKB, PLC- γ , PKC- α , Ca²⁺ et PKC- Θ . Le flux calcique est également augmenté. Tous ces événements conduisent à l'activation des facteurs de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), NF- κ B, et AP-1, responsables de l'expression de cytokines et de molécules régulant la prolifération et la survie cellulaire. Ainsi, l'IL-2 est

produite et relarguée dans l'environnement cellulaire. L'expression de la chaîne α de son récepteur (CD25) est également régulée positivement.

b. Expansion clonale

L'IL-2 est une interleukine indispensable à la fois à la survie et à la prolifération des LT. En effet, la liaison de l'IL-2 à son récepteur active de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, telles que les facteurs de transcription STAT, les kinases MAPK, et PKB. Les kinases PKB et MAPK sont impliquées dans la phosphorylation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, inhibant ainsi leur activité et protégeant par conséquent les cellules de l'apoptose (Brenner *et al.*, 2008).

L'IL-2 est également responsable de la prolifération des LT suite à l'initiation de la réponse immunitaire. Cette phase de prolifération intense des LT est appelée expansion clonale.

Les LT récemment activés sont la principale source de l'IL-2. Ces cellules, une fois activées, augmentent en outre l'expression des chaînes α et β de leurs récepteurs de l'IL-2. Ceci suggère que les LT activés peuvent produire et répondre à l'IL-2 selon un mode paracrine ou selon un mode autocrine.

Le récepteur de l'IL-2 est composé des trois chaînes suivantes :

- La chaîne γ , ou CD132, commune aux récepteurs de plusieurs cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21), regroupées de ce fait au sein d'une même famille.
- La chaîne β ou CD122, commune aux récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15.
- La chaîne α , ou CD25, spécifique de l'IL-2.

Deux types de récepteurs de l'IL-2 existent :

- Un récepteur de faible affinité, composé de la chaîne γ et de la chaîne β , exprimé faiblement par les cellules naïves CD4⁺, plus fortement par les cellules CD4⁺ mémoires, mais aussi par les lymphocytes NK.
- Un récepteur de haute affinité, constitué des trois chaînes, exprimé essentiellement par les LT activés et les cellules Treg (Letourneau *et al.*, 2009).

Les lymphocytes T sont répartis en deux sous-populations phénotypiques, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. Les cellules CD8⁺, qui reconnaissent les peptides antigéniques couplés aux molécules CMH de classe I, relarguent des molécules destinées à lyser la cellule à laquelle elles sont liées, et sont donc appelées LT cytotoxiques.

Les cellules CD4⁺, reconnaissant des peptides couplés aux molécules CMH II, sont impliquées dans la coordination des réponses immunitaires en produisant de nombreuses cytokines. Les LT CD4⁺ peuvent se différencier en au moins quatre types de cellules effectrices (figure 24).

- Les cellules Th1 (T helper type 1), qui produisent de grandes quantités d'IFN- γ , d'IL-2, et des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , sont impliquées dans la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires. L'IL-2 est nécessaire à leur survie et leur prolifération.
- Les cellules Th2 (T helper type 2) produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, sont responsables de la réponse immunitaire humorale, et sont impliquées dans les maladies de type allergique et parasitaires. Leur prolifération est induite en présence d'IL-4 exogène.
- Les cellules Th17 produisent de l'IL-17, sont impliquées dans la défense contre les bactéries extracellulaires et les champignons, et pourraient être liées à la pathologie des maladies inflammatoires auto-immunes, telles que la maladie de Crohn ou le psoriasis. L'IL-2 serait capable d'inhiber leur génération en interférant avec le facteur de transcription ROR γ t (Retinoid-Related Orphan Receptor γ t), responsable de la production d'IL-17 (Letourneau *et al.*, 2009).
- Les cellules régulatrices Treg sont caractérisées par l'expression de CD25, et du facteur de transcription FOXP3. Ce facteur induit l'expression de CD25, et de CTLA-4 et supprime la production de l'IL-2, de l'IFN- γ , et de l'IL-4 par les cellules effectrices. Les Treg sont donc capables de supprimer la prolifération et la différenciation des LT effecteurs in vivo, ainsi que les fonctions effectrices des LB, NK, NKT, macrophages et cellules dendritiques. La production des cytokines TGF- β et IL-10 serait en partie responsable de cette fonction (Letourneau *et al.*, 2009). Les Treg dépendent fortement de l'IL-2 exogène pour leur survie et leur prolifération, bien qu'ils n'en produisent pas.

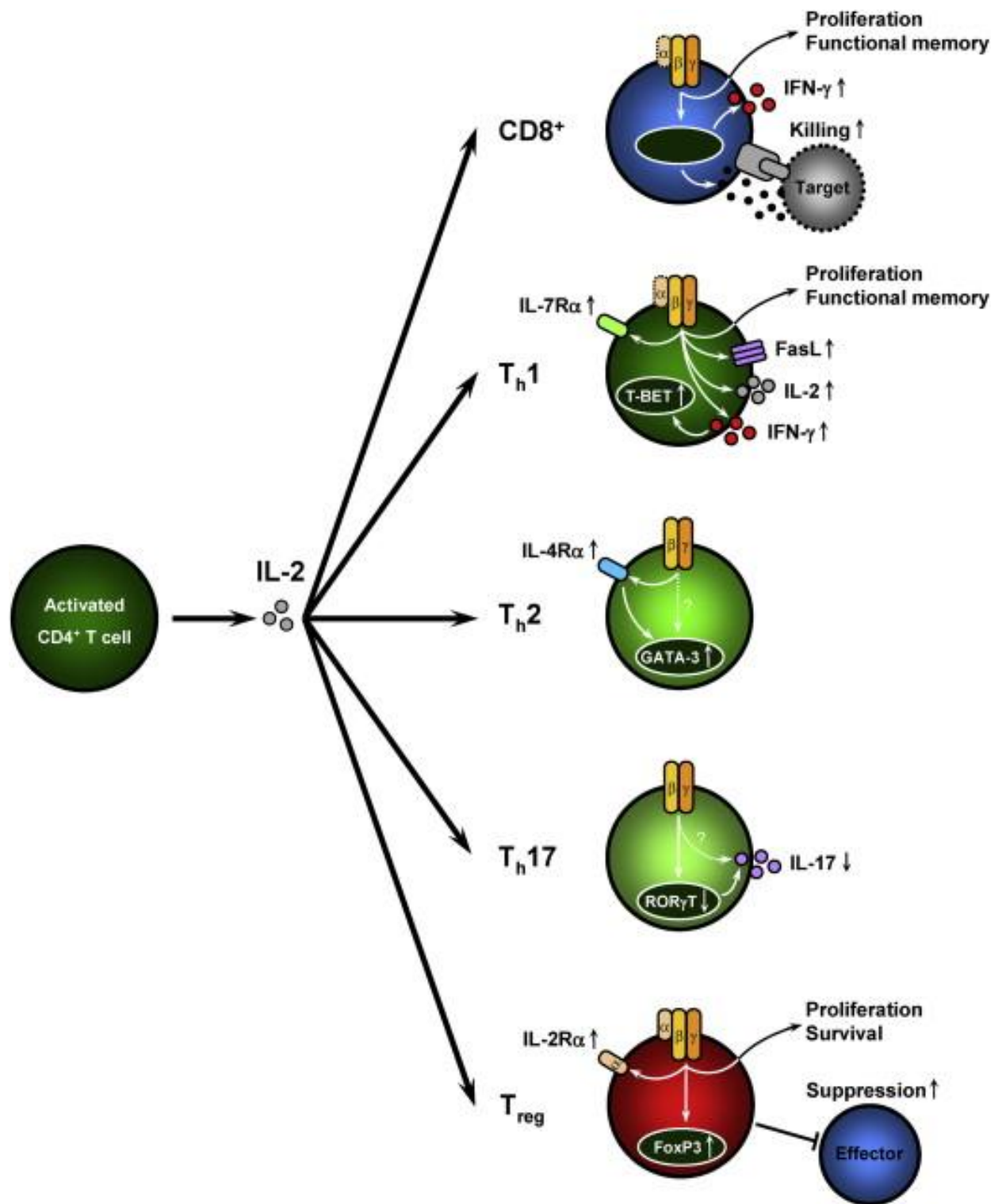


Figure 24. Effet de l'IL-2 sur les différentes sous-populations de LT. La liaison de l'IL-2 à son récepteur induit la régulation positive ou négative de facteurs de transcription, représentés dans les ronds noirs et l'expression des récepteurs de cytokines, indiqués à gauche des cellules et régule les fonctions effectrices, indiquées à droite des cellules. De Letourneau *et al.* (Letourneau *et al.*, 2009).

Hormis l'IL-2, d'autres cytokines participent au développement et à l'homéostasie des LT. En effet, la lymphopénie des LT observée chez les patients X-SCID, présentant des

mutations sur la chaîne commune du récepteur γ_c , ou chez les souris déficientes en chaîne γ_c , suggère qu'une ou plusieurs cytokines reconnues par cette chaîne de récepteur sont importantes pour le développement des LT. La chaîne γ_c est un des composants des récepteurs de l'IL-7 et de l'IL-15.

Le récepteur de l'IL-15 (IL-15R) est très proche de celui de l'IL-2, car les chaînes β et γ sont identiques alors que la chaîne IL-15R α est spécifique de l'IL-15R. L'IL-15 est produite par les macrophages et les cellules dendritiques en réponse à une stimulation *via* un TLR (Toll-Like Receptor) ou par un interféron de type I (IFN α ou β) (You *et al.*, 2006). L'expression de l'IL-15R α est induite à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺, mais celle de la chaîne IL-15R β est plus importante sur les CD8⁺ que sur les CD4⁺, ce qui rend les CD8⁺ plus sensibles à cette cytokine (You *et al.*, 2006). La prolifération des LT CD8⁺ mémoires effecteurs serait probablement due à l'interleukine IL-15 (Adams *et al.*, 2003). En effet, des souris déficientes en IL-15 ou en IL-15R α , ne produisent pas de CD8⁺ mémoires ; les cellules NK ou NKT sont également absentes (Kennedy *et al.*, 2000).

Le récepteur de l'IL-7 (IL-7R) est composé de la chaîne spécifique de l'IL-7, IL-7R α , et de la chaîne commune γ_c . L'IL-7 est également une cytokine importante pour l'homéostasie des lymphocytes. En effet, des souris déficientes en IL-7 ou IL-7R α souffrent d'hypoplasie lymphoïde B et T (von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). L'IL-7 est produite par les cellules stromales dans le thymus et dans la moelle osseuse chez la souris (Mazzucchelli *et al.*, 2009). L'IL-7 pourrait également être sécrétée par les cellules endothéliales lors de l'inflammation. L'expression de l'IL7R α est régulée négativement sur les LT activés par leur TCR. Au contraire, son expression est régulée positivement sur les LT CD8⁺ effecteurs qui vont devenir des LT mémoires (Kaech *et al.*, 2003). L'IL-7 est également nécessaire à la survie des LT CD4⁺ mémoires effecteurs et centraux, car il induit la régulation positive de l'expression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique (Kondrack *et al.*, 2003).

c. Différenciation des lymphocytes T mémoires

L'IL-7 et l'IL-15 participent donc à la génération des LT mémoires. Ces cellules, caractérisées par une longue durée de vie, ne correspondent qu'à une petite fraction des LT spécifiques de l'antigène, soit environ 5% du nombre de cellules observé lors du pic de

l'expansion (Boyman *et al.*, 2009). En effet, la grande majorité des LT effecteurs va disparaître par apoptose lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire (cf paragraphe suivant) alors que les LT mémoires vont survivre (figure 21).

Les lymphocytes T mémoires sont caractérisés par une expression à leur surface de CD45RO chez l'homme et CD44 chez la souris. A la fois chez l'homme, et chez la souris, les LT mémoires sont répartis en LT mémoires effecteurs et LT mémoires centraux. Les LT mémoires centraux expriment, comme les cellules naïves, les récepteurs de localisation (ou homing) CCR7 et CD62L (L-sélectine), leur permettant de circuler à travers les ganglions lymphatiques et la rate, alors que les LT mémoires effecteurs régulent négativement l'expression de CD62L et expriment un grand nombre de récepteurs de homing leur permettant de passer au travers des tissus non-lymphoïdes (Boyman *et al.*, 2009). La majorité des LT mémoires effecteurs se trouve dans un état activé.

Les LT mémoires centraux expriment fortement à leur surface les molécules CD127 (IL-7R α) et CD122 (IL-2R β), leur permettant de répondre à des taux normaux circulants d'IL-7 et d'IL-15, et par conséquent, de survivre et de proliférer afin de conserver l'homéostasie (Boyman *et al.*, 2009). Les LT mémoires effecteurs sont également soumis à une prolifération à l'homéostasie, mais plus faible que celle des LT mémoires centraux, ce qui serait corrélé à leur plus courte durée de vie. Leur prolifération est également due à la stimulation par l'IL-15 (Boyman *et al.*, 2009).

2. Apoptose des lymphocytes T

La forte capacité de prolifération des LT suite à la stimulation par un antigène nécessite un contrôle efficace de leur durée de vie, afin de maintenir l'homéostasie du système immunitaire. Les LT mémoires sont donc conservés et les LT effecteurs seront éliminés par apoptose.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, décrite pour la première fois dans les années 1970 (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose des lymphocytes T peut être initiée par différents mécanismes.

La première voie est activée suite à la re-stimulation par un antigène du récepteur du lymphocyte T (TCR). Cette réactivation de la cellule induit une activation des récepteurs de mort. Ce mécanisme est appelé AICD, pour Activation-Induced Cell Death.

La seconde voie est initiée principalement suite à une déprivation en facteurs de croissance, ou suite à un traitement par des molécules cytotoxiques ou un dommage de l'ADN. Elle implique une modification de l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2).

Ces deux voies conduiront à l'activation des protéases, appelées caspases, impliquées dans le déclenchement de l'apoptose.

Ces deux types d'apoptose peuvent coopérer dans le but de mettre fin à la réponse immunitaire ; ce qui est primordial pour la régulation de l'homéostasie. En effet, une invalidation par mutation des gènes codant pour les récepteurs de mort ou pour les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 induit des lymphadénopathies ou des lymphomes chez la souris ou l'homme (Strasser 2005).

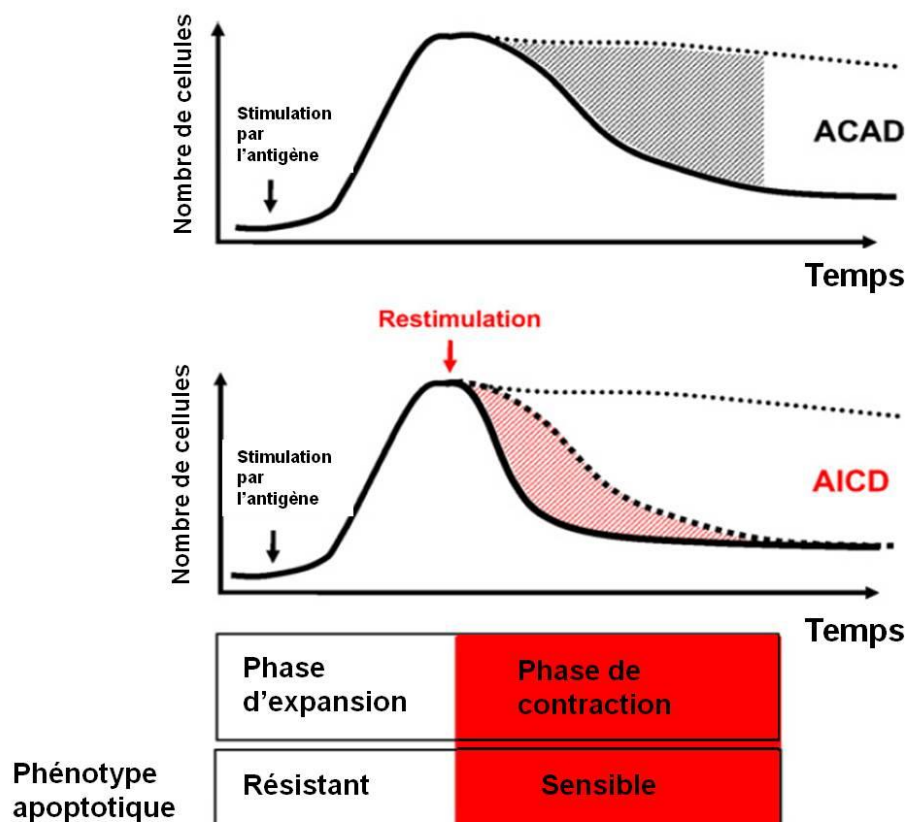


Figure 25. Schéma de la réponse immunitaire. Suite à l'activation par l'antigène, les LT sont activés et prolifèrent. Une fois le pic de la réponse immunitaire atteint, les LT deviennent sensibles à la mort cellulaire et leur nombre décline pendant la phase de contraction. Deux morts peuvent être induites : l'ACAD ou Activated Cell Autonomous Death, et l'AICD (Activation-Induced Cell Death). D'après Brenner *et al.* (Brenner *et al.*, 2008).

a. Mécanismes de l'apoptose des cellules eucaryotes

L'apoptose est une mort cellulaire caractérisée par différents changements morphologiques : un rétrécissement cellulaire, une fragmentation du noyau accompagnée de la condensation de la chromatine. Le bourgeonnement de la membrane plasmique (ou blebbing) également induit provoque fréquemment la formation de petites vésicules délimitées par une membrane plasmique intacte appelées corps apoptotiques.

La destruction cellulaire est due à des protéases appelées caspases (cysteine aspartic acid-specific proteases). Les caspases sont des enzymes très spécifiques qui clivent leurs substrats après un motif tétrapeptidique où le quatrième peptide est un acide aspartique, comme par exemple le motif DEVD (acide aspartique, acide glutamique, valine, acide aspartique). Ces protéases sont présentes dans les cellules vivantes sous forme de précurseurs inactifs, appelés pro-caspases. Toutes les caspases possèdent un domaine identique, comprenant un pro-peptide suivi d'une grande et d'une petite sous-unité. La longueur du pro-peptide est variable, et il peut être utilisé pour recruter l'enzyme sur l'apoptosome. Deux domaines sont conservés chez toutes ces molécules : le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) et le domaine DED (Death Effector Domain), permettant aux protéines d'interagir avec d'autres molécules possédant ce même domaine. Les caspases sont toutes activées par un clivage protéolytique entre la grande et la petite sous-unité pour former un hétérodimère. Ces enzymes fonctionnent alors sous forme d'hétérotétramères, composés de deux hétérodimères.

Toutes les caspases de la famille ne sont pas impliquées dans le processus apoptotique. Certaines caspases sont impliquées dans les processus inflammatoires (caspases-1, -4, -5, et -12) (figure 26). Les autres caspases, responsables de l'apoptose, peuvent être divisées en deux groupes :

- les caspases initiatrices (caspases-8 et -9), capables de s'auto-activer et d'initier l'activation des caspases effectrices.
- les caspases effectrices (caspases -3, -6 et -7), responsables du clivage de nombreux substrats.

Les caspases initiatrices sont activées par clivage protéolytique suite à la liaison des protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated via Death Domain) ou APAF1 (Apoptotic-Protease-Activating Factor 1) aux domaines DED (Death Effector Domain) ou CARD

(Caspase-Recruitment Domain) des pro-caspases-8 ou -9 respectivement.

Les caspases effectrices sont activées par clivage protéolytique par les caspases initiatrices. La dernière caspase de la cascade est la caspase-3. Son activation va induire le clivage de nombreuses protéines et enclencher le processus de « démolition » cellulaire.

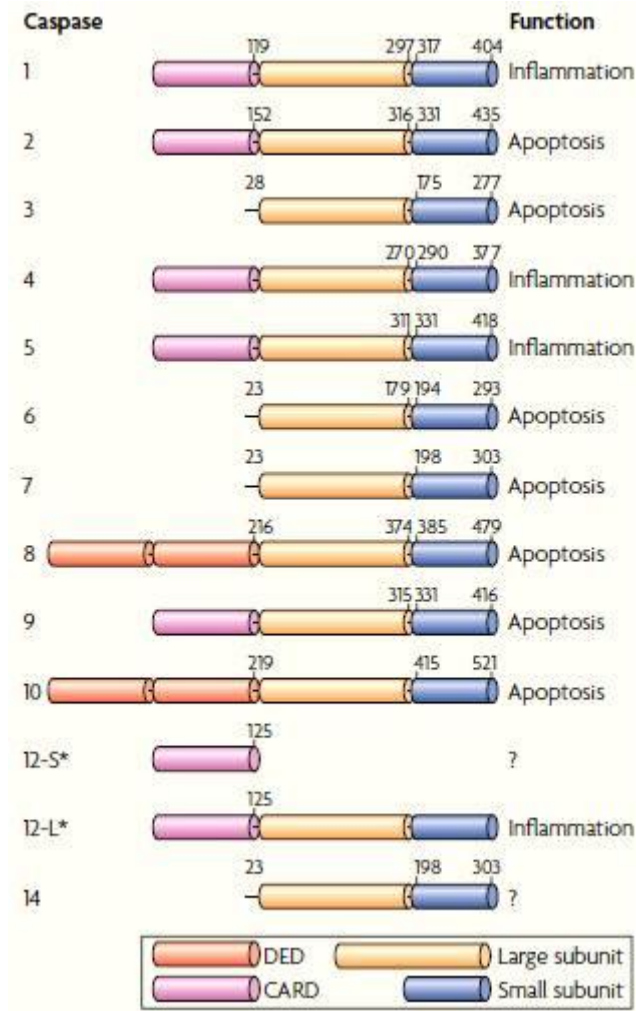


Figure 26. Représentation schématique des caspases. DED : Death Effector Domain, CARD : Caspase-Recruitment Domain. De Taylor et al. (Taylor et al., 2008).

Les substrats des caspases sont nombreux. Plus d'une centaine de molécules ont été recensées.

Tout d'abord, les composants du cytosquelette sont affectés : les constituants des microfilaments d'actine, tels que l'actine, et les protéines associées à l'actine, qui comprennent la myosine, les spectrines, l' α -actinine, la gelsoline, et la filamine. Les protéines des microtubules, que sont la tubuline, et ses protéines associées telles que TAU et la chaîne

intermédiaire de la dynéine. Des filaments intermédiaires, telles que la vimentine, les kératines, et les lamines nucléaires sont également des substrats des caspases. La protéolyse de ces constituants participe certainement au bourgeonnement cellulaire (également appelé blebbing) et à la rétraction de la membrane cellulaire, observée lors des premières étapes de l'apoptose. L'effecteur Rho ROCK1 (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1), un régulateur de la dynamique du cytosquelette d'actine, est également impliqué dans le phénomène de blebbing. Les caspases clivent son domaine C-terminal, lui permettant de phosphoryler la chaîne légère de la myosine et d'induire la contraction des filaments d'actine (figure 27). Au cours de ces étapes, les cellules épithéliales apoptotiques stimulent les cellules voisines pour former un réseau de câbles actine-myosine afin d'induire le remplissage du trou laissé par cette cellule dans le but de maintenir l'intégrité épithéliale (Taylor *et al.*, 2008).

La fragmentation du noyau est due à la désintégration de la lamina nucléaire et à l'effondrement de l'enveloppe nucléaire. En effet, les caspases clivent les lamines A, B et C. La modification du cytosquelette d'actine, entourant la lamina nucléaire, participe également à la fragmentation du noyau (Taylor *et al.*, 2008).

La fragmentation de l'ADN internucléosomal est due à la caspase-activated DNase (CAD), également appelée DNA Fragmentation Factor (DFF). Cette enzyme est activée par protéolyse par les caspases effectrices de son inhibiteur ICAD (Inhibitor of CAD) (figure 27). Les fragments nucléaires ainsi générés présentent une taille d'environ 200 paires de bases. La condensation de la chromatine est due à la phosphorylation des histones 2B, provoquée par la kinase MST1 (Mammalian Sterile 20-like kinase 1). Cette kinase est en effet activée par clivage par la caspase-3, lui permettant alors de migrer dans le noyau (figure 27). La protéine nucléaire PARP-1 (Poly(ADP-ribose) Polymerase-1, impliquée dans la détection et la réparation du dommage à l'ADN, ainsi que dans la régulation de la transcription, est en outre clivée par les caspases.

Les capacités de transcription et de traduction de la cellule sont également affectées. Les caspases ciblent des facteurs de transcription, tels que NFAT, SP1 ou NF- κ B, ainsi que des protéines impliquées dans la traduction, comme par exemple, les facteurs d'initiation de la traduction eIF2a, eIF3, eIF4, ou encore des protéines ribosomales (RPPO, p70S6K). L'ARN ribosomal est également dégradé.

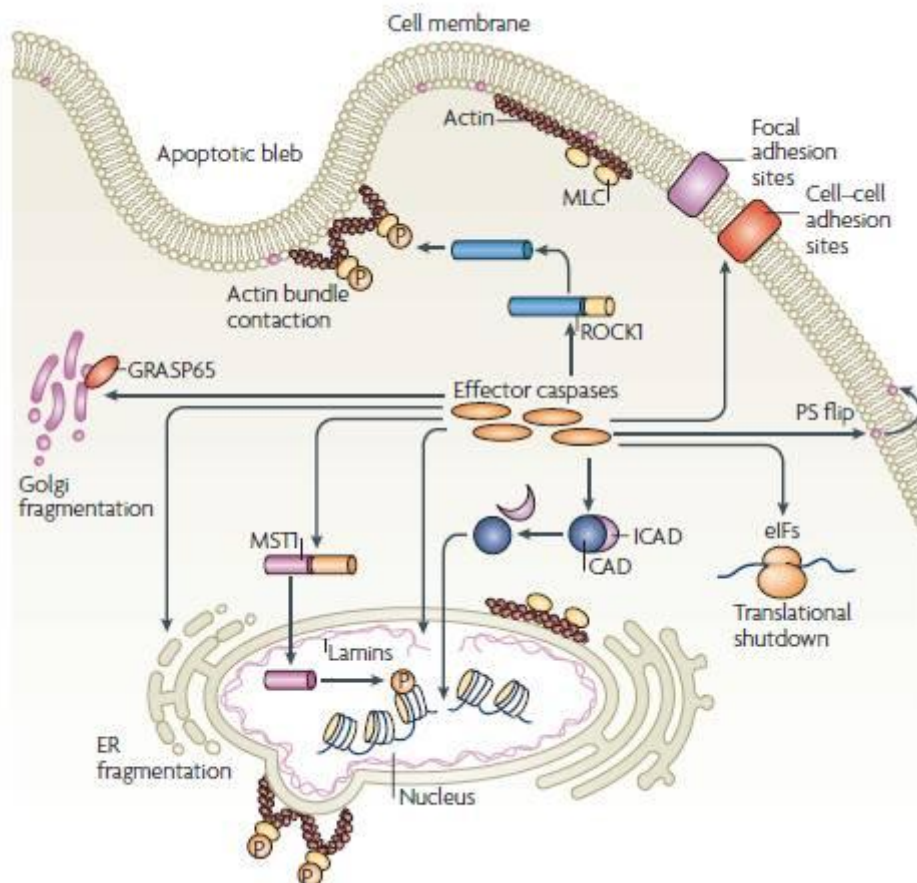


Figure 27. Les caspases induisent la destruction des structures cellulaires vitales et des organites. Les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7) orchestrent le démantèlement des différentes structures cellulaires en clivant de nombreux substrats. PS : Phosphatidylsérine, ER : Réticulum Endoplasmique, MLC : Myosin Light Chain. De Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2008).

Les cellules apoptotiques se détachent de la matrice extracellulaire, car les liaisons cellule-cellule et les liaisons cellule-matrice sont rompues. En effet, les protéines des sites d'adhésion focale sont des substrats des caspases : FAK (Focal Adhesion Kinase), p130^{cas}, et Tensine. Leur protéolyse est corrélée à une inhibition de leur localisation subcellulaire au niveau des sites d'adhésion focale (figure 27). Les protéines β - et γ -catenines sont également clivées par la caspase-3, ce qui empêche leur interaction, elle-même nécessaire à la liaison aux cadhérines.

Les différents organites de la cellule en apoptose sont fragmentés. L'appareil de Golgi serait fragmenté suite au clivage par les caspases de la protéine de stockage du Golgi GRASP65. D'autres protéines du Golgi qui sont des substrats des caspases pourraient également être impliquées dans la destruction de l'appareil de Golgi.

Au cours des dernières étapes de l'apoptose, le réticulum endoplasmique est complètement remodelé pour générer suite à un « pincement », une membrane entourant la chromatine et responsable de la formation des corps apoptotiques.

La mitochondrie est également fragmentée suite à la perméabilisation de sa membrane (cf page 69) en de nombreux petits organites dispersés au sein de la cellule.

Enfin, d'autres composants cellulaires sont des substrats des caspases, même s'ils n'ont pas d'impact sur le changement phénotypique de la cellule. Ainsi, certaines sous-unités du protéasome sont clivées par les caspases. Ces protéases clivent aussi des enzymes régulant le métabolisme.

La dernière étape de la destruction cellulaire consiste en la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. Les cellules phagocytaires peuvent être des macrophages ou d'autres cellules possédant des capacités de phagocytose. Afin d'être reconnue, la cellule apoptotique doit générer des sites de liaison avec les phagocytes et relarguer des molécules chimio-attractantes pour attirer ces phagocytes. Les cellules phagocytaires, quant à elles, doivent exprimer les récepteurs correspondant.

La formation des corps apoptotiques à partir des cellules serait un phénomène permettant de faciliter la phagocytose, car leur taille est nettement inférieure à celle des cellules, et permettrait ainsi de diminuer l'activation du système immunitaire par les protéines relarguées par les cellules apoptotiques.

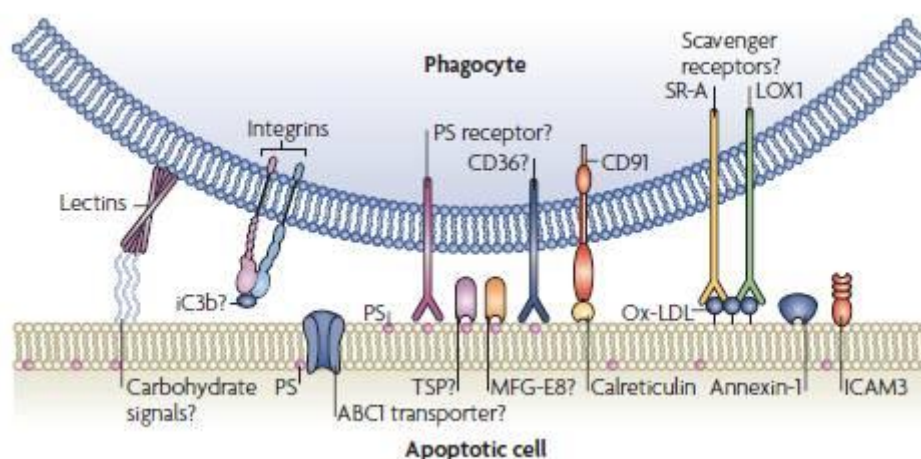


Figure 28. Les cellules apoptotiques expriment des ligands qui induisent leur phagocytose. PS : Phosphatidylserine ; SR-A et LOX1 ; récepteurs scavengers ; MFG-E8 : milk fat globule-EGF factor-8; De Taylor *et al.* (Taylor *et al.*, 2008).

La phosphatidylsérine (PS) est la molécule permettant l'interaction avec les phagocytes la mieux caractérisée. Dans les cellules vivantes, la PS est confinée au sein de la membrane plasmique interne, mais elle se retrouve localisée sur la membrane externe quand l'apoptose est induite. Cette externalisation est due aux caspases, mais le mécanisme exact n'a pas été identifié. Plusieurs protéines ont été proposées comme étant les récepteurs de la PS : la protéine milk fat globule-EGF factor-8 et la thrombospondine ou CD36 (figure 28).

D'autre part, les lipoprotéines oxydées pourraient être reconnues par les récepteurs scavengers (SR-A et LOX1) de la cellule phagocytaire. La protéine chaperone du réticulum endoplasmique, la calréticuline, est aussi capable de se lier au récepteur CD91 ou LRP. Cette liaison induit la phagocytose. La molécule d'adhésion ICAM3 et l'annexine-1 sont également des molécules exposées à la surface de la cellule. Enfin, des intégrines pourraient être impliquées dans la reconnaissance des cellules mortes en se liant à la thrombospondine, ou au complément iC3b (figure 28).

Les molécules chimio-attractantes identifiées sont d'une part, la lysophosphatidylcholine, qui serait générée grâce à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine membranaire par une enzyme activée par la caspase-3, et d'autre part, la protéine ribosomale S19, ou les aminoacyl-ARNt synthétases.

b. « Activation Induced Cell Death »: AICD

L'AICD consiste en une induction de la mort des LT déjà activés par une seconde stimulation de leur TCR. Alors que les LT étaient résistants à l'AICD pendant la phase d'expansion clonale, ils y deviennent sensibles durant la phase de contraction de la réponse immunitaire (figure 25).

La stimulation du TCR peut donc induire deux réponses différentes : soit la prolifération cellulaire, soit l'AICD. La transition entre ces deux réponses serait due principalement au facteur de transcription NF- κ B. En effet, NF- κ B, lié constitutivement à son inhibiteur IKK (I κ B kinase), est activé quand ce dernier est phosphorylé et le libère. NF- κ B va ensuite migrer dans le noyau, où il va induire soit la transcription de gènes anti-apoptotiques, tels que *bcl-2*, *bcl-xl*, *iap/xiap*, *gadd45b*, *flip*, soit la transcription des ligands des facteurs de mort, tels que *cd95l* (ou *fasl*). La régulation de l'activité de NF- κ B est due à la

kinase HPK1 (TCR-proximal kinase hematopoietic progenitor kinase 1). Cette sérine-thréonine kinase, exprimée exclusivement dans le tissu hématopoïétique, est activée par la stimulation des LT ou LB par leur récepteur. La forme « full length » de la kinase induit la transcription des gènes cibles de NF- κ B. Au contraire, lors de la phase de forte prolifération des LT, la kinase HPK1 est clivée. Le produit de clivage C-terminal de HPK1 bloque l'activation de IKK, et donc l'activation de NF- κ B, et par conséquent sensibilise les LT à l'AICD (Brenner *et al.*, 2008).

Une autre étude a également montré que la stimulation du TCR était responsable de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la mitochondrie. L'augmentation des ROS, concomitante à l'augmentation du taux intracellulaire de Ca²⁺, due à la stimulation du TCR, seraient responsables de la régulation positive de l'expression de CD95L (Kaminski *et al.*, 2007).

L'AICD nécessite également la présence de l'IL-2. En effet, cette cytokine serait responsable de la régulation positive de l'expression du ligand de Fas (FasL ou CD95L) et de la régulation négative de l'expression de c-FLIP, une molécule anti-apoptotique.

L'AICD implique donc les récepteurs de mort, qui initient la voie extrinsèque de l'apoptose (figure 29). Suite à la stimulation du TCR, une réorganisation des membranes plasmiques serait enclenchée, afin de relocaliser ces récepteurs de mort dans les rafts lipidiques.

Deux récepteurs de mort ont été identifiés : TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) et FAS (ou CD95). Ces récepteurs de mort appartiennent à la famille des TNFR (Tumour-necrosis factor (TNF)-Receptor Family), et contiennent un domaine de mort intracellulaire (DED) (Strasser *et al.*, 2009).

Les récepteurs de mort sont exprimés dans les LT, mais leur activité est inhibée par des protéines c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein). Ces protéines ressemblent aux caspases, car elles possèdent un domaine DED, qui leur permet d'interagir avec le DED des récepteurs de mort. Leur expression est régulée positivement suite à la stimulation du TCR, alors qu'elle est inhibée quand les cellules deviennent sensibles à l'AICD (Strasser *et al.*, 2009).

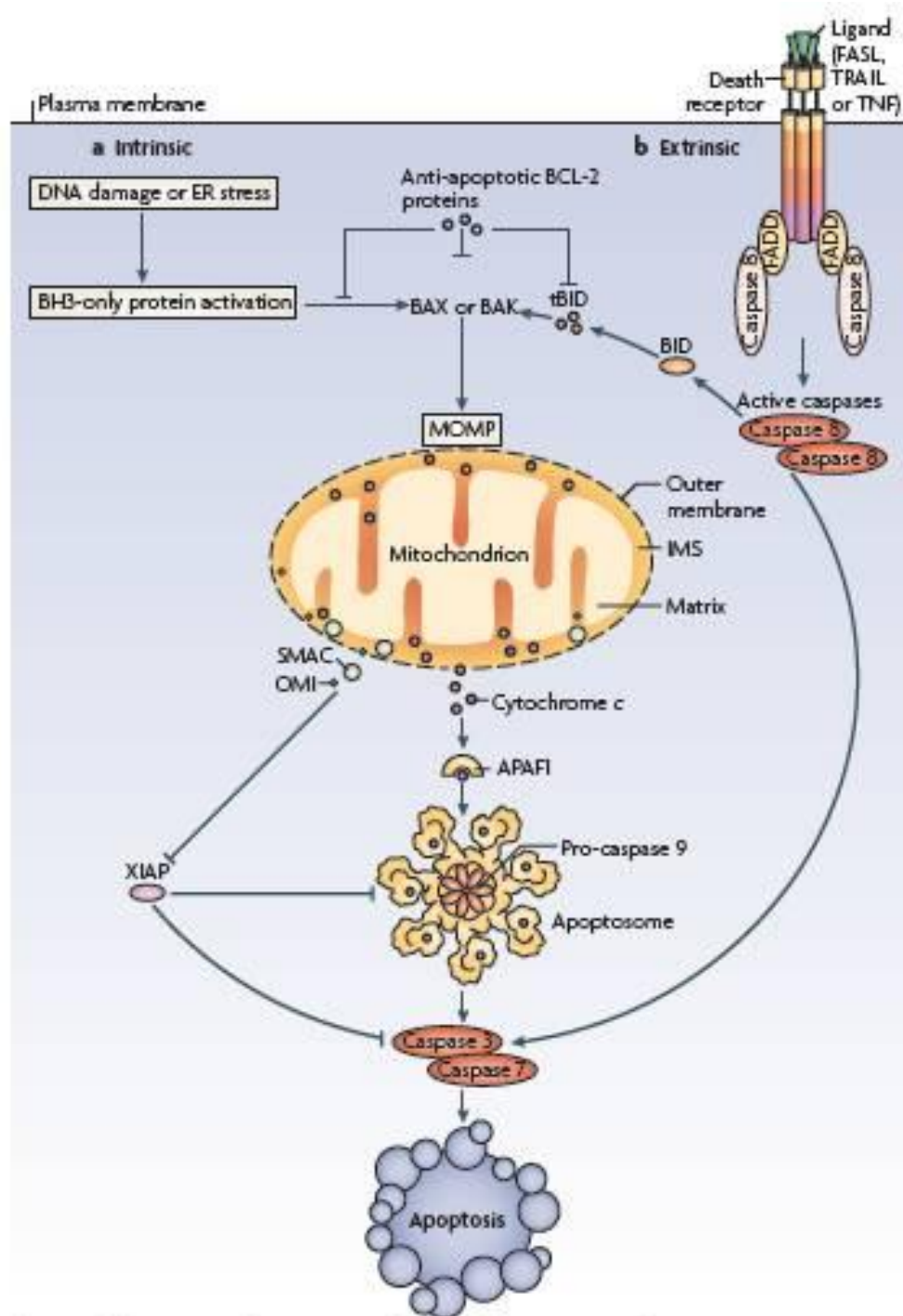


Figure 29. Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. La relocalisation des facteurs de mort (FASL, TRAIL) induit leur dimérisation, puis le recrutement de l'adaptateur FADD et la pro-caspase-8. La caspase-8 activée peut cliver directement les pro-caspases effectrices -3 et -7, ou peut activer la voie intrinsèque de l'apoptose en clivant BID. De Tait *et al.* (Tait and Green 2010).

La liaison des ligands (TRAIL ou FasL) à leurs récepteurs de mort à la surface des LT induit le recrutement des molécules adaptatrices, telles que FADD (FAS-Associated Death Domain protein). Ce complexe est appelé DISC pour Death-Inducing Signaling Complex. FADD se dimérise et se lie *via* les domaines de mort, à la caspase initiateur, la caspase-8. La caspase-8 se clive directement, et active les caspases exécutrices, qui sont les caspases -7 et -3. L'apoptose est ainsi enclenchée, comme décrit dans le paragraphe précédent.

La caspase-8 activée peut également amplifier la cascade apoptotique en interagissant avec la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette protéase peut ainsi activer par clivage la protéine pro-apoptotique BID (BH3-Interacting-Domain death agonist). Le produit de clivage, appelé tBID (truncated BID) est capable d'interagir avec les molécules de la famille Bcl-2, de déstabiliser l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques et d'induire la dépolarisation du potentiel de membrane mitochondriale (figure 29) (Tait and Green 2010).

Enfin, plusieurs cytokines seraient capables d'influencer l'AICD. Ainsi, l'interleukine-15 (IL-15) augmente la survie cellulaire, et pourrait inhiber la sensibilisation à l'AICD dépendante de l'IL-2 (Brenner *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'IL-4 sensibilise les cellules à l'AICD, en régulant positivement l'expression du récepteur de l'IL-2. Une autre cytokine, l'INF- γ , pourrait, en outre, induire l'expression de la caspase-8 et donc augmenter la sensibilité des LT à l'AICD (Brenner *et al.*, 2008).

c. Apoptose par déprivation en facteurs de croissance

La déprivation en facteurs de croissance est également induite lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire, mais contrairement à l'AICD, cette apoptose ne nécessite pas l'activation des récepteurs de mort. Elle implique la mitochondrie et uniquement la voie intrinsèque de l'apoptose (figure 30).

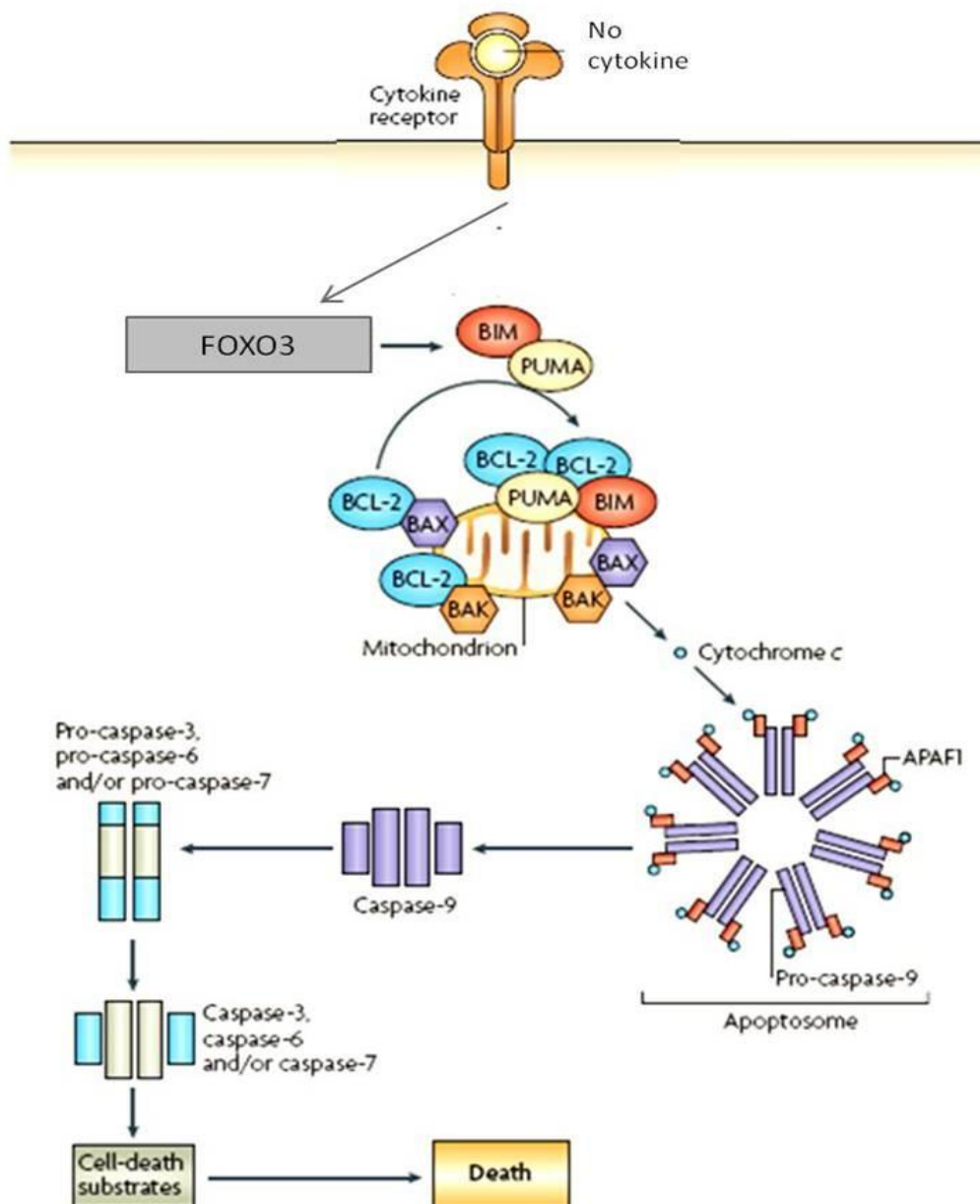


Figure 30. La voie intrinsèque de l'apoptose dans les lymphocytes T. D'après Krammer *et al.* (Krammer *et al.*, 2007).

i. Description du mécanisme

La déprivation en facteurs de croissance diminue la phosphorylation des kinases en aval des récepteurs de cytokines, telles que les kinases PI3K, et Akt/PKB et induit l'activation de facteurs de transcription, comme FOXO3. Ce facteur de transcription sera détaillé plus précisément dans le chapitre suivant (cf page 80). Des kinases, connues pour être induites

suite à un stress, peuvent également être activées (cf paragraphes suivants).

Ces différents signaux conduisent à une augmentation de l'expression des isoformes de BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death) ainsi qu'à une modification de leur localisation cellulaire. En effet, dans les cellules vivantes, cultivées en présence de facteurs de croissance, BIM est séquestré dans le cytosquelette, ou est lié à des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, localisées à la mitochondrie. Suite à un signal apoptotique, tel que la déprivation en facteurs de croissance, BIM va migrer vers la mitochondrie, où il va modifier les interactions entre les protéines de la famille Bcl-2. Son rôle et sa régulation seront détaillés dans les paragraphes suivants (cf page 72).

Plusieurs modèles de régulation de l'équilibre entre protéines pro et anti-apoptotiques ont été proposés. Le premier modèle, considéré comme le modèle de liaison directe, suggère que les protéines BH3-only telles que BIM et PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) pourraient se lier directement à BAX (Bcl-2–Associated X protein) et BAK (Bcl-2 homologous Antagonist-Killer). Le second modèle, également appelé modèle de déplacement, propose que BAX et BAK s'auto-activent une fois que les protéines BH3-only sont déplacées de leur interaction avec les protéines Bcl-2-like (Weber *et al.*, 2007).

Suite à leur activation, les protéines BAX et BAK vont subir des changements conformationnels, induisant leur migration vers la mitochondrie, et leur oligomérisation. Un modèle de l'oligomérisation de BAK a été proposé récemment (Dewson *et al.*, 2008). En effet, les protéines BAK activées exposent leur domaine BH3, ce qui leur permet de s'insérer dans la poche hydrophobe d'une molécule BAK adjacente et de former un dimère symétrique (figure 31).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) est un phénomène se produisant rapidement après l'activation des protéines BAX et BAK. Le nombre de dimères BAX ou BAK nécessaires à la perméabilisation de la membrane n'est pas clairement défini.

Deux types de pore peuvent être formés au sein de la membrane mitochondriale : les canaux protéiques et les pores lipidiques. Les canaux protéiques pourraient être créés à partir des canaux VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Les pores lipidiques seraient dus à l'interaction des protéines BAK ou BAX avec les lipides de la membrane externe et formeraient des pores transitoires ou des micelles inversés pour libérer les protéines de

l'espace inter-membranaire (Tait and Green 2010).

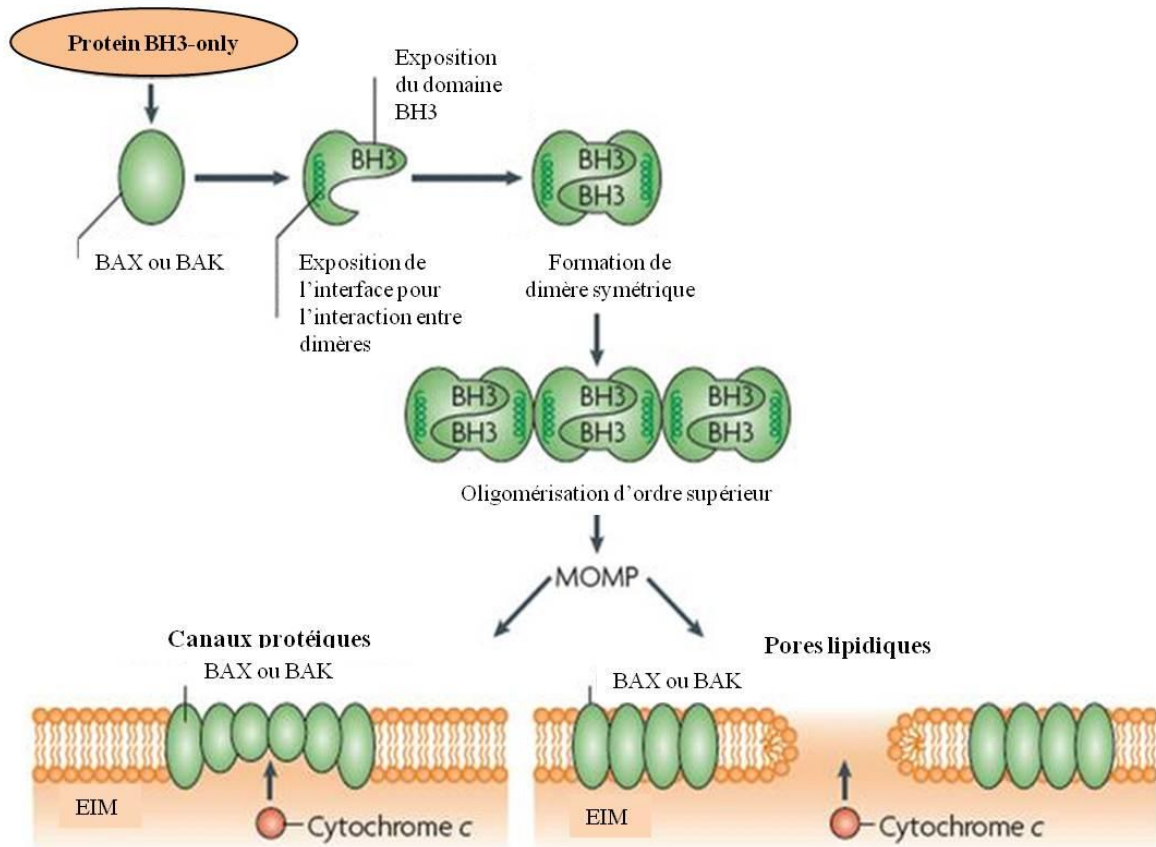


Figure 31. Activation de BAX et BAK et formation des pores dans la membrane mitochondriale. EIM : Espace Inter-membranaire Mitochondrial. D'après Tait *et al.* (Tait and Green 2010).

La formation des pores dans la mitochondrie permet dans un premier temps le relargage de protéines pro-apoptiques, à partir de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, et dans un second temps l'entrée des caspases activées et la dépolarisation du potentiel mitochondrial.

Les protéines relarguées les mieux caractérisées sont le cytochrome C, la molécule APAF1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), les protéines pro-apoptiques Smac/Diablo, Omi/HTR2, et la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor).

Le cytochrome C et sa molécule adaptatrice APAF1 sont donc les premières molécules relarguées. Le cytochrome C est présent dans l'espace inter-mitochondrial sous forme libre, ou séquestré dans des cristaux. Certaines protéines de la famille Bcl-2, telles que BIM, BID

ou BIK (Bcl-2-Interacting Killer), seraient capables de remodeler les cristaux afin de libérer le cytochrome C. La protéine DRP1 (Dystrophin Related Protein 1), impliquée dans la fission mitochondriale, pourrait également faciliter la sortie du cytochrome C (Tait and Green 2010).

Dans le cytosol, un cytochrome C se lie à un monomère APAF1, et induit ainsi des changements de sa conformation. Des protéines APAF1 s'oligomérisent alors en une structure heptamérique en forme de roue, appelée apoptosome (figure 29). La formation de l'apoptosome peut être inhibée par des nucléotides tels que l'ATP, ou l'ARN de transfert (tRNA), des protéines de choc thermique (HSP70 et HSP90), par une élévation des taux intracellulaires de Ca^{2+} , ou par des taux intracellulaires normaux de potassium (Tait and Green 2010). L'apoptosome recrute la pro-caspase-9, induit sa dimérisation et son clivage en caspase-9 active (Strasser 2005). Cette caspase initiatrice va donc ensuite activer les caspases exécutrices et induire le clivage de centaines de protéines, qui résultera en l'apoptose.

Les autres molécules relarguées lors de la MOMP, qui sont la protéine SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase), également nommée DIABLO (Direct IAP-Binding protein with Low pI), et la protéine OMI (ou HTRA2), sont des protéines pro-apoptotiques. Elles inhibent ainsi l'activité des protéines anti-apoptotiques telles que XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) en interagissant avec elles (Tait and Green 2010). En effet, XIAP est une protéine capable de s'insérer dans le site catalytique de la caspase initiatrice -9 et des caspases effectrices -3 et -7 et donc d'empêcher leur activité enzymatique (Altieri 2010). La protéine XIAP permet alors d'inhiber le déclenchement de l'apoptose, dû par exemple à la MOMP accidentelle de certaines mitochondries.

Enfin, la protéine AIF (Apoptosis Inducing Factor) est une autre protéine de l'espace inter-membranaire, ancrée dans la membrane interne, qui est relarguée plus tardivement. Ce délai s'explique par le fait que AIF doit être clivée par la protéase cytosolique Calpaïne I (Tait and Green 2010). La protéine AIF, localisée dans le cytoplasme, induit la condensation de la chromatine nucléaire, ainsi que la fragmentation de l'ADN (Daugas *et al.*, 2000).

Le maintien du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta \Psi_m$) est indispensable aux fonctions de la mitochondrie : la synthèse de l'ATP, l'homéostasie des ions, et l'import protéique dans la matrice mitochondriale. La perturbation du $\Delta \Psi_m$ est due en partie au clivage par les caspases d'un composant du complexe I de la chaîne respiratoire, la NADH-

ubiquinone oxidoreductase 75kDa subunit (NDUFS1). En effet, quand la membrane mitochondriale est perméabilisée, les caspases exécutrices entrent dans la mitochondrie et clivent NDUFS1, ce qui conduit à une réduction de l'activité du complexe I, une chute du $\Delta\Psi_m$, une réduction rapide de la synthèse d'ATP, et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production des ROS mitochondriaux oxyde les protéines HMGB1 (High Mobility Group Protein B1) (Tait and Green 2010).

ii. Rôle de la protéine BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)

BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death) est une des protéines pro-apoptotiques régulant l'apoptose induite par la déprivation en facteurs de croissance des lymphocytes T.

En effet, la déprivation en IL-2 de « blastes » de LT CD8⁺ humains provoque une forte expression de BIM ainsi qu'une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique MCL1 (Myeloid Cell Leukemia sequence 1) ; ce qui conduit à l'apoptose de ces cellules (Bosque *et al.*, 2007).

Le rôle de BIM dans l'apoptose des LT activés a également été démontré chez la souris. En effet, des « blastes » de LT issus de souris déficientes en BIM, déprivés en IL-2, entrent moins vite en apoptose que des blastes de LT des souris contrôles (Erlacher *et al.*, 2006).

Une autre protéine de la même famille que BIM, appelée PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) a également été décrite comme étant impliquée dans l'induction de l'apoptose des LT activés. Ainsi, des « blastes » de LT, issus de souris invalidées en PUMA, également déprivés en IL-2 sont protégés transitoirement de l'apoptose. Il existerait en outre une synergie d'action entre BIM et PUMA au cours de l'apoptose dans ces conditions. En effet, l'invalidation concomitante de BIM et de PUMA protège les LT de l'apoptose induite par la déprivation en IL-2 autant que la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Erlacher *et al.*, 2006).

Enfin, il a été observé que des souris déficientes en BIM et PUMA dans les cellules du tissu hématopoïétique développent des splénomégalias, des lymphadénopathies et également des hyperplasies thymiques, suggérant le rôle primordial de ces protéines dans l'apoptose des LT (Erlacher *et al.*, 2006).

BIM est également responsable de l'apoptose induite par déprivation en IL-7 de

thymocytes. Ainsi, l'invalidation de la protéine BIM par shRNA diminue l'apoptose induite par déprivation en IL-7 de la lignée cellulaire de thymocytes murins D1 (Li *et al.*, 2010).

BIM participe aussi à l'apoptose des LT activés déprivés en IL-7. En effet, les LT CD8⁺ spécifiques du virus de l'herpès (HSV) issus de souris déficientes en BIM, sont protégés de l'apoptose induite par la déprivation en IL-7 (Pellegrini *et al.*, 2003).

Ainsi, lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire, BIM est impliqué dans l'apoptose des lymphocytes T effecteurs, qui expriment très peu le marqueur de surface CD127, qui est la chaîne α du récepteur de l'IL-7. En effet, l'apoptose des LT CD8⁺ et CD4⁺ CD127^{lo} est plus importante chez les souris sauvages, que chez les souris déficientes en BIM. De plus, le nombre de cellules CD127^{hi} augmente fortement chez les souris BIM^{-/-}, alors qu'il décline un peu chez les souris contrôles, durant la phase de contraction de la réponse immunitaire, ce qui signifie que BIM régule également la génération de la population de LT mémoires via l'IL-7 (Wojciechowski *et al.*, 2006).

iii. Description de la protéine BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)

La protéine BIM appartient à la famille de protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). La famille Bcl-2 est caractérisée par des régions spécifiques d'homologie appelées Bcl-2 Homology domain (BH) : BH1, BH2, BH3, et BH4. En fonction du nombre de domaines présents sur chaque protéine, la famille Bcl-2 est divisée en un groupe de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-2, Bcl-X_L, ou MCL1 (Myeloid-Cell Leukaemia sequence 1), et en deux sous-groupes de protéines pro-apoptotiques : les protéines similaires à BAX (BAX-like), qui sont BAX (Bcl-2-associated-X protein) et BAK (Bcl2-antagonist Killer) par exemple, et les protéines possédant seulement un domaine BH3 (les protéines BH3-only), telles que BIM, BAD (Bcl-2 Antagonist of cell Death), BIK, NOXA ou PUMA (figure 32) (Strasser 2005).

Le domaine BH3, est le domaine commun à toutes ces protéines. Il s'organise en une hélice α amphipathique, qui confère à la protéine la capacité de se lier à une fente hydrophobique à la surface des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. Les protéines BIM ont la capacité d'interagir avec d'autres protéines de la famille Bcl-2 à la surface de la mitochondrie (Strasser 2005).

Ainsi, BIM interagit avec Bcl-2 *via* son domaine BH3, ou peut se lier à Bcl-XL dans

des lymphocytes T quiescents (Zhu *et al.*, 2004). BIM peut également interagir avec Bcl-W (O'Connor *et al.*, 1998).

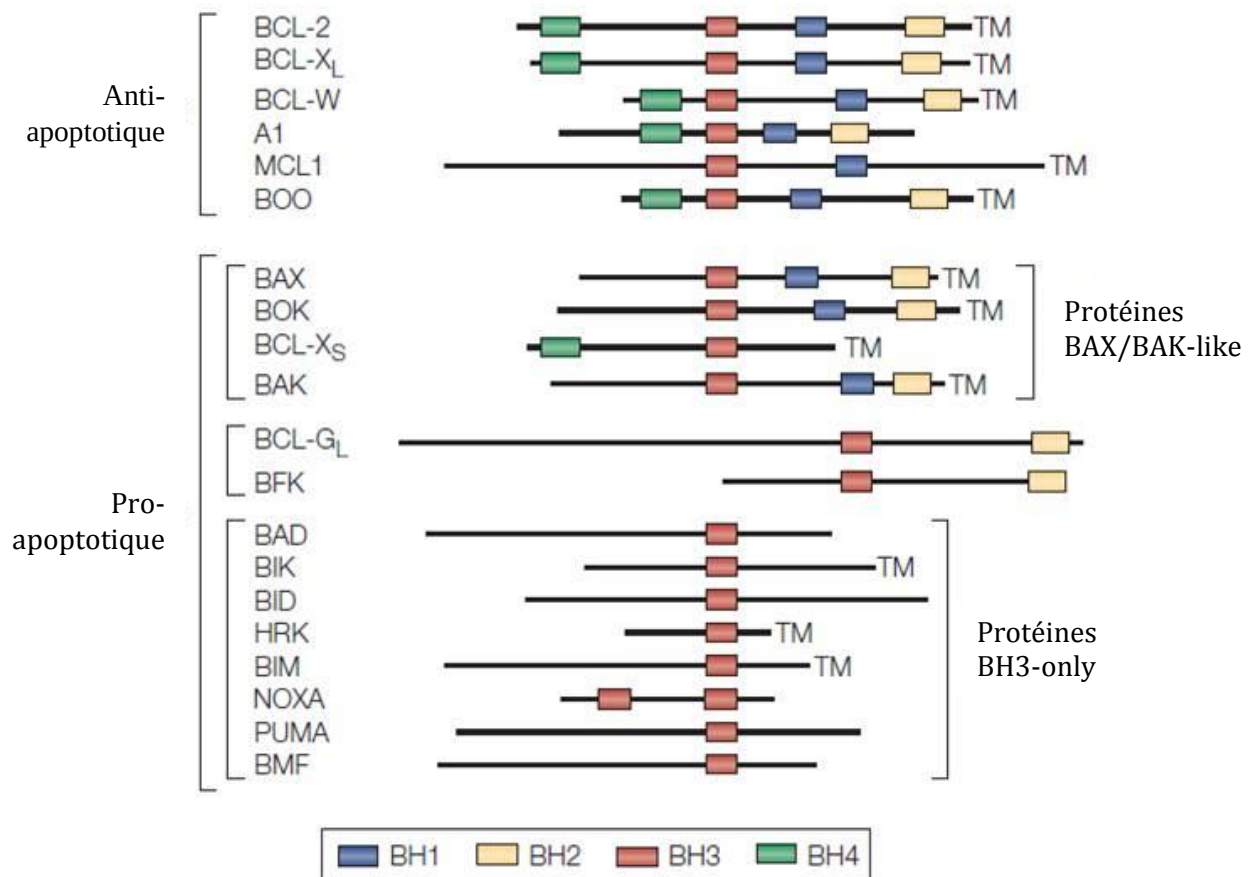


Figure 32. Schéma des protéines de la famille Bcl-2 exprimées chez les mammifères. Les protéines sont réparties en plusieurs sous-groupes : les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Les différents domaines BH sont représentés avec 4 couleurs différentes. TM : domaine TransMembranaire. D'après Strasser (Strasser 2005).

Trois isoformes de BIM, issues d'un épissage alternatif, ont été décrites chez la souris (O'Connor *et al.*, 1998) :

- la forme Extra-Long (EL), composée de 198 acides aminés,
- la forme Long (L), composée de 138 acides aminés,
- la forme Short (S), composée de 112 acides aminés.

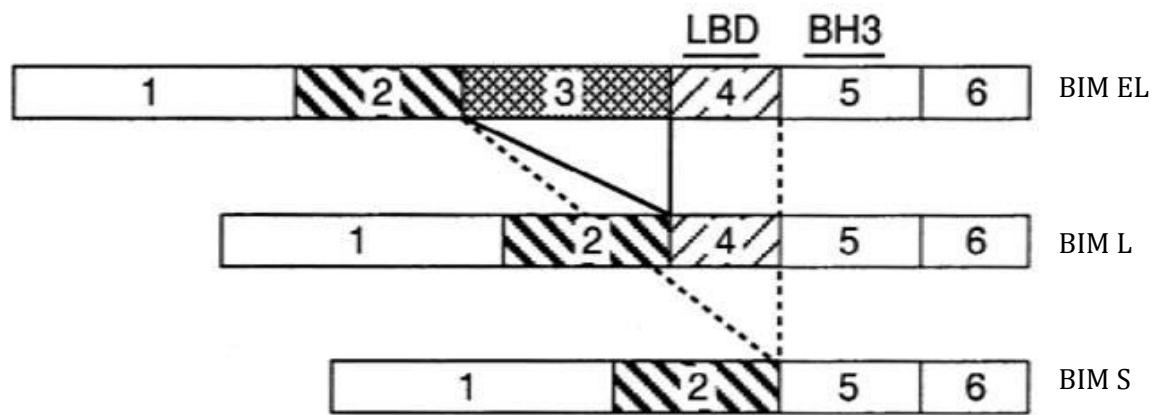


Figure 33. Représentation schématique des différents domaines des trois isoformes de BIM. Le domaine BH3 est le domaine 5. Les domaines différant d'une isoforme à une autre sont les domaines 3 et 4. Le domaine 4 est le domaine de liaison à la chaîne LC8 de la dynéine (LBD). D'après Bouillet *et al.* (Bouillet *et al.*, 2001).

Le domaine 3 est présent uniquement dans l'isoforme BIM EL.

Le domaine LBD, ou domaine de liaison à la chaîne légère de la dynéine, est présent dans les isoformes EL et L (figure 33). La protéine BIM S, ne possédant pas de domaine LBD, ne peut être séquestrée par le cytosquelette et possède, de ce fait, le pouvoir apoptotique le plus puissant.

La région BH3, retrouvée dans les trois isoformes, est essentielle à l'interaction de BIM avec Bcl-2, et cette interaction conditionne le pouvoir apoptotique de BIM (O'Connor *et al.*, 1998).

La région C-terminale est une région hydrophobe ; une région équivalente à cette région C-terminale est souvent retrouvée chez les autres protéines de la famille. Ce domaine permet alors aux protéines d'être localisées dans les membranes intra-cytoplasmiques (O'Connor *et al.*, 1998).

D'autres isoformes ont été décrites chez l'homme. Elles sont au nombre de 18 au total, comme décrit dans la lignée cellulaire HSC-2, issue d'un carcinome de cellule squameuse orale (Adachi *et al.*, 2005). Ces protéines sont des produits d'un épissage alternatif généré à partir des 11 exons identifiés sur le gène humain de *bim* (figure 34). Ces isoformes ne possèdent pas toutes un domaine BH3 ou un domaine de liaison aux chaînes de dynéine. Adachi et collaborateurs ont donc proposé une nouvelle nomenclature en classant les protéines en fonction des domaines présents (figure 34). Les isoformes, autres que BIM EL, L et S, ont été très peu décrites.

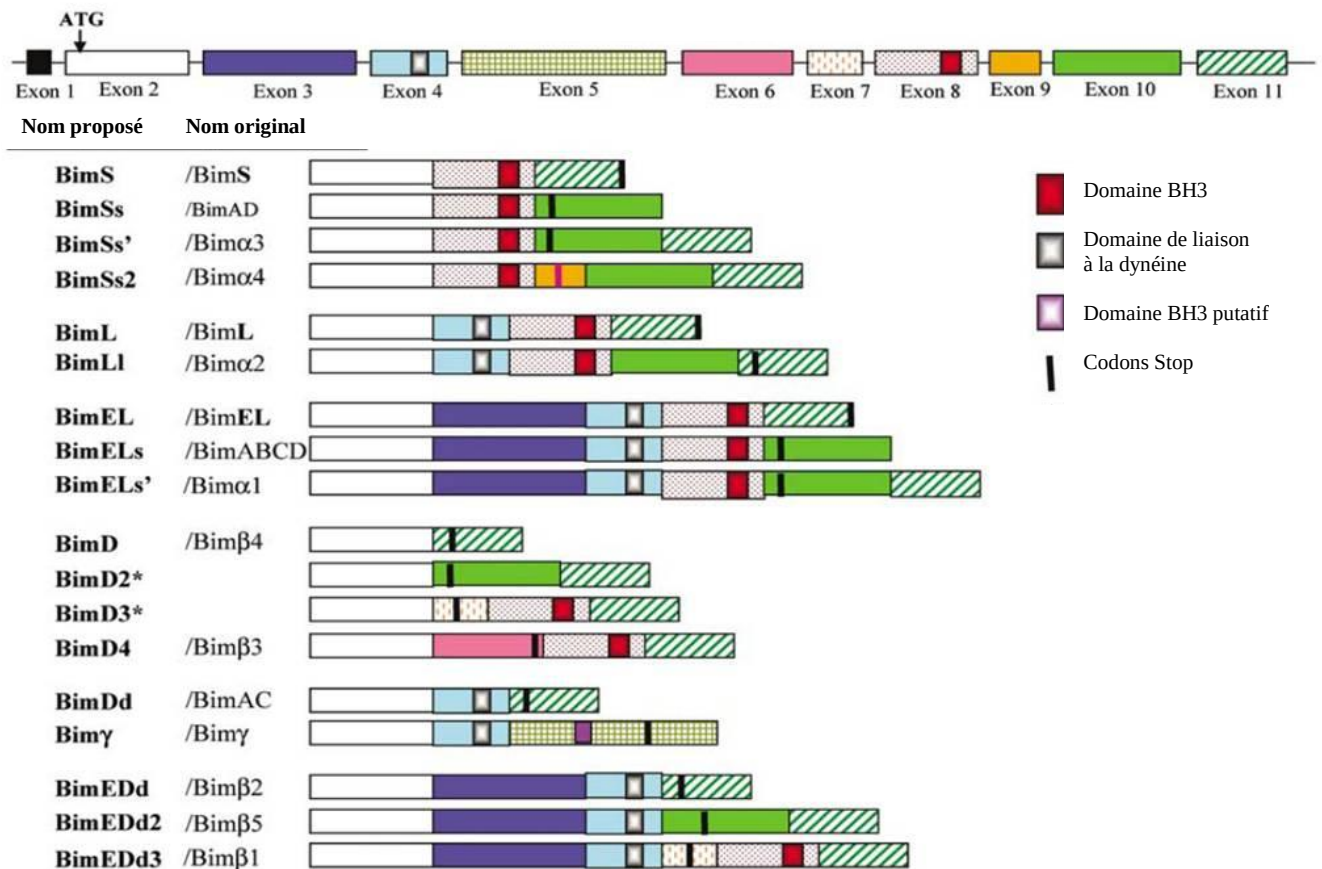


Figure 34. Alignement des différentes isoformes humaines de BIM. Les noms originaux donnés aux protéines ainsi que la nouvelle nomenclature sont indiqués à gauche des isoformes. D'après Adachi *et al.* (Adachi *et al.*, 2005).

Les protéines BIM EL et BIM L sont exprimées dans de nombreux types cellulaires, tels que les cellules hématopoïétiques, les cellules épithéliales, les neurones et les cellules germinales, tandis que la protéine BIM S n'est pas détectée dans ces cellules (O'Reilly *et al.*, 2000). La protéine BIM EL est plus fortement exprimée que la protéine BIM L.

Les isoformes EL et L de BIM sont capables de se lier avec une haute affinité à la chaîne légère du complexe moteur microtubulaire, *via* leur domaine LBD. Suite à un signal pro-apoptotique, elles se détachent des microtubules et migrent jusqu'à la mitochondrie (Putcha *et al.*, 2003). Cependant, BIM EL et BIM L peuvent être constitutivement associées à la mitochondrie dans des cellules en culture, telles que le lymphocytes T (Zhu *et al.*, 2004). La protéine BIM EL serait liée directement ou indirectement à la mitochondrie, comme si elle était une protéine intégrée à la membrane. BIM EL est ainsi colocalisée avec la protéine de la membrane mitochondriale externe TOM20 (Translocase of the Outer Mitochondrial membrane, 20 kDa) dans les LT en apoptose. Le domaine BH3 et la région C-terminale sont

impliqués dans la localisation mitochondriale de BIM EL. Au contraire, l'isoforme BIM L serait liée en tant que protéine à la périphérie de la membrane mitochondriale (Zhu *et al.*, 2004).

La protéine BIM S peut également être localisée à la surface de la mitochondrie, ce qui a été démontré par des expériences de surexpressions transitoires de cette protéine dans les cellules HeLa (Weber *et al.*, 2007). Son expression induit l'oligomérisation de Bax, et son recrutement à la mitochondrie. Des expériences réalisées en surexprimant des mutants de BIM S incapables d'interagir avec les protéines Bcl-2 ou MCL1 ont permis de montrer que cette interaction n'est pas nécessaire à l'activité pro-apoptotique de BIM S. BIM S doit uniquement être localisée à la mitochondrie pour induire l'apoptose de ces cellules (Weber *et al.*, 2007).

iv. Régulation de l'activité de BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death)

La régulation de l'activité de BIM est complexe et implique à la fois une régulation transcriptionnelle et à la fois des modifications post-traductionnelles.

Ainsi, l'expression du gène *bim* est principalement due au facteur de transcription FOXO3 (Forkhead box O3) dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2, et dans la lignée cellulaire BaF/3 déprivée en IL-3 (Dijkers *et al.*, 2000; Stahl *et al.*, 2002). La déprivation en facteurs de croissance induit une déphosphorylation de la kinase Akt/PKB et par conséquent, active FOXO3 (Dijkers *et al.*, 2002). Il existe en effet deux sites de fixation pour FOXO3 sur le promoteur de *bim* (Gilley *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) est également capable d'induire la transcription de *bim*, dans des neurones murins primaires déprivés en NGF (Nerve Growth Factor) (Putcha *et al.*, 2003).

D'autre part, des modifications post-traductionnelles peuvent réguler l'expression de BIM ou son activité.

Une MAPK, la kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), est capable de phosphoryler BIM EL, dans des cellules vivantes, et donc d'induire sa dégradation. Ainsi, le facteur de croissance neuronal (NGF) induit la phosphorylation de la sérine 109 ou de la

thréonine 110 de la protéine BIM dans les cellules PC12 (Biswas and Greene 2002).

ERK1/2 phosphoryle également la sérine 65 de la protéine BIM EL dans les cellules fibroblastiques CCL39, mais aucunement les sérines des protéines BIM L et BIM S (Ley *et al.*, 2004). ERK1/2 peut donc interagir avec BIM EL *via* le domaine unique de cette protéine, composé des acides aminés 70 à 97 (Ley *et al.*, 2004). La phosphorylation de BIM sur cette sérine 65 induit sa dégradation par le protéasome dans les cellules fibroblastiques (Ley *et al.*, 2003) ou dans les cellules érythroleucémiques K562 (Luciano *et al.*, 2003).

L'activation de la voie de la kinase ERK inhibe également l'expression de BIM induite lors de l'anoïkis, le processus de détachement des cellules épithéliales de la matrice extracellulaire, dans les lignées de cellules épithéliales MCF-10A (Reginato *et al.*, 2003).

Enfin, trois sérines (S55, S65 et S100) de la protéine BIM EL sont phosphorylées par ERK dans la lignée cellulaire FL5.12 cultivée en présence d'IL-3. Cette phosphorylation diminue l'expression de BIM et donc son interaction avec d'autres protéines de la famille Bcl-2, telles que BAX. L'apoptose est par conséquent inhibée (Harada *et al.*, 2004) (figure 35).

Au contraire, des kinases peuvent augmenter l'activité de BIM.

Ainsi, BIM L est phosphorylée sur la thréonine 56 par la kinase JNK-1 dans les cellules HEK293T. La thréonine 56 fait partie intégrante du motif DKSTQTP, présent dans les protéines BIM EL et BIM L, leur permettant d'interagir avec DLC1, la chaîne légère de la dynéine (Lei and Davis 2003). La phosphorylation de la thréonine 56 inhibe la liaison de BIM au cytosquelette (Lei and Davis 2003).

Par ailleurs, la kinase JNK, activée par la kinase MKK7 suite à la déprivation en NGF des neurones, est retrouvée dans la mitochondrie. Elle est alors capable d'induire la phosphorylation de la sérine 65 de BIM EL (Putcha *et al.*, 2003). Cette phosphorylation induit l'activation de BIM et augmente l'apoptose.

Les sérines 55 et 65 de BIM EL, décrites ci-dessus, sont également phosphorylées dans la lignée cellulaire D1 déprivée en IL-7. En effet, la déprivation en IL-7 des cellules D1 ne modifie ni l'expression de l'ARNm ou de la protéine BIM, ni son interaction avec Bcl-2, ni sa localisation subcellulaire. Seule la phosphorylation sur les sérines 55 et 65 diminue l'interaction de BIM avec la protéine anti-apoptotique MCL1. En effet, la surexpression de

mutants de BIM EL non phosphorylables sur ces sérines diminue l'apoptose des cellules D1 induite par la déprivation en IL-7 (Li *et al.*, 2010).

Enfin, la MAP kinase p38 peut phosphoryler la sérine 65 de BIM EL. p38 est ainsi activée dans les cellules PC12 suite à un stress oxydant induit par l'arsenic de sodium. p38 phosphoryle alors BIM EL, ce qui induit l'apoptose (Cai *et al.*, 2006).

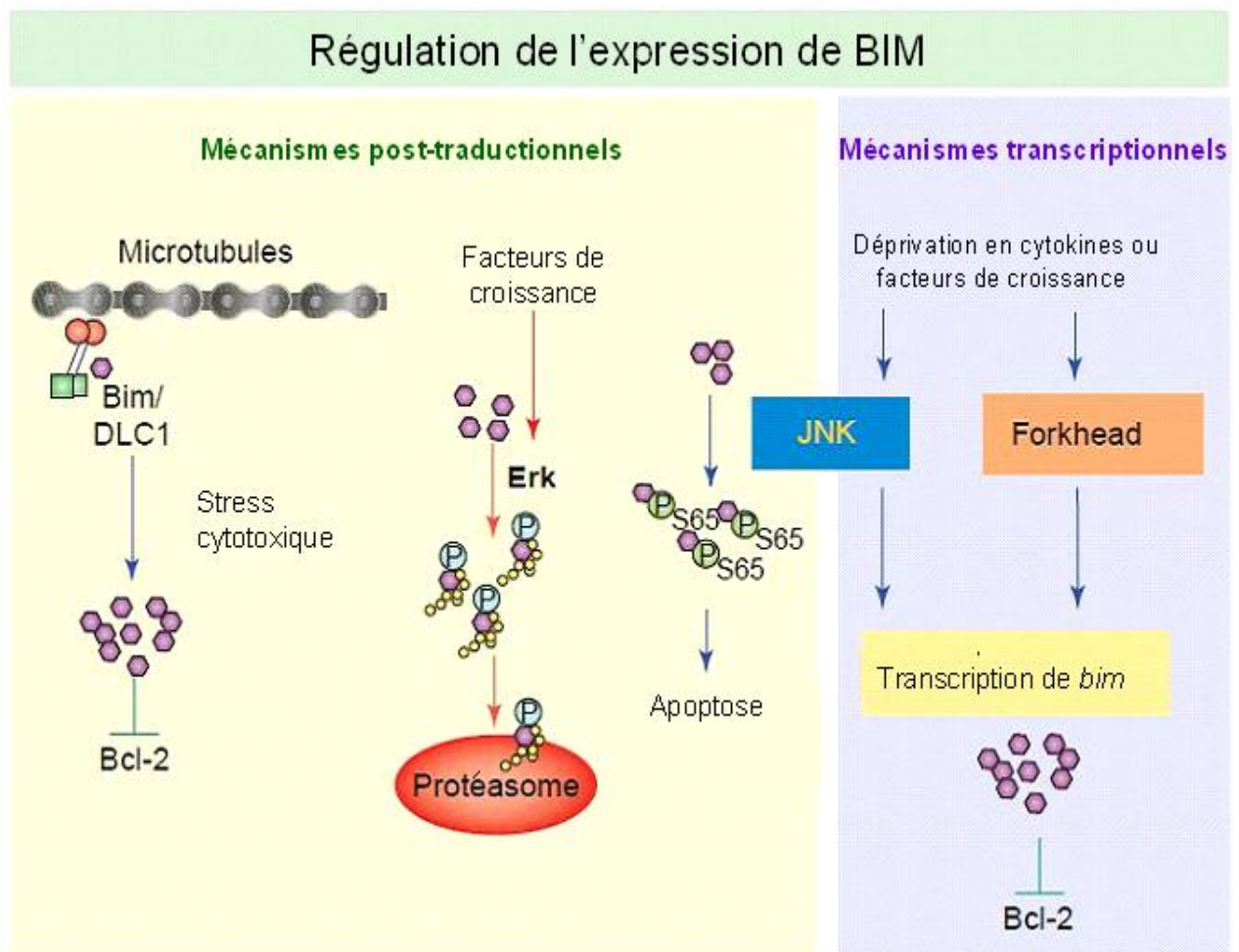


Figure 35. Schéma récapitulatif de la régulation de l'activité de la protéine BIM. D'après Strasser *et al.* (Strasser and Pellegrini 2004).

III. Rôle des facteurs FOXO (Forkhead box O) dans la mort cellulaire

Les protéines FOXO (Forkhead box O) appartiennent à une famille de facteurs de transcription appelés Forkhead et caractérisés par la présence d'un domaine conservé ; le domaine de liaison à l'ADN, appelé « forkhead domain ». Le nom Forkhead dérive du nom donné au gène *fork head* de *Drosophila melanogaster* (*fh*). Etant donné que la structure tridimensionnelle de ce domaine est organisée en trois hélices α et deux larges boucles, les protéines forkhead sont parfois appelées protéines à hélices ailées (Burgering 2008).

La famille de protéines Forkhead est composée d'au moins 43 membres chez l'homme. La nomenclature actuelle, réalisée suite à une analyse phylogénétique, répartit les protéines forkhead en 19 sous-classes désignées par des lettres (A à S). Au sein de ces sous-classes, les protéines sont désignées par des numéros (Kaestner *et al.*, 2000). Ainsi, la protéine FOXO3 est la troisième protéine de la sous-classe O de la famille Forkhead.

1. Description de la famille FOXO

La sous-classe O (« Other ») est composée de quatre membres :

- FOXO1, qui peut être appelé FKHR (Forkhead Drosophila homolog 1 rhabdomyosarcoma)
- FOXO3, également nommé FKHL1 (Forkhead Drosophila homolog 1 rhabdomyosarcoma Like 1)
- FOXO4, ou AFX (Acute leukemia Fusion gene located in chromosome X),
- FOXO6.

Des variants d'épissage ont été décrits pour *foxo1*, *foxo3*, et *foxo4*.

Des orthologues de FOXO ont été identifiés chez *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*, nommés respectivement DAF-16 (DAuer Formation-16) et dFOXO (Fu and Tindall 2008).

Les protéines FOXO1, FOXO3 et FOXO4 sont exprimées de façon ubiquitaire chez l'homme. Cependant, leur expression varie en fonction du tissu ou du type cellulaire. Ainsi, FOXO1 est fortement exprimée dans le tissu adipeux, alors que FOXO4 est très exprimée dans le muscle squelettique, et FOXO3 dans le cerveau, le cœur, le rein, la rate et le foie. Quant à FOXO6, son expression est restreinte au cerveau (Burgering 2008).

a. Structure

Les protéines humaines FOXO1 et FOXO3 sont constituées respectivement de 655 et 673 acides aminés, alors que FOXO4 contient 505 acides aminés et FOXO6 seulement 559 acides aminés. Elles sont composées de différents domaines : un domaine de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain) très conservé entre ces protéines, une région riche en prolines (Pro), deux signaux de localisation nucléaire (NLS) en aval du DBD, une séquence d'export nucléaire (NES) et un domaine de transactivation en position C-terminale (figure 36).

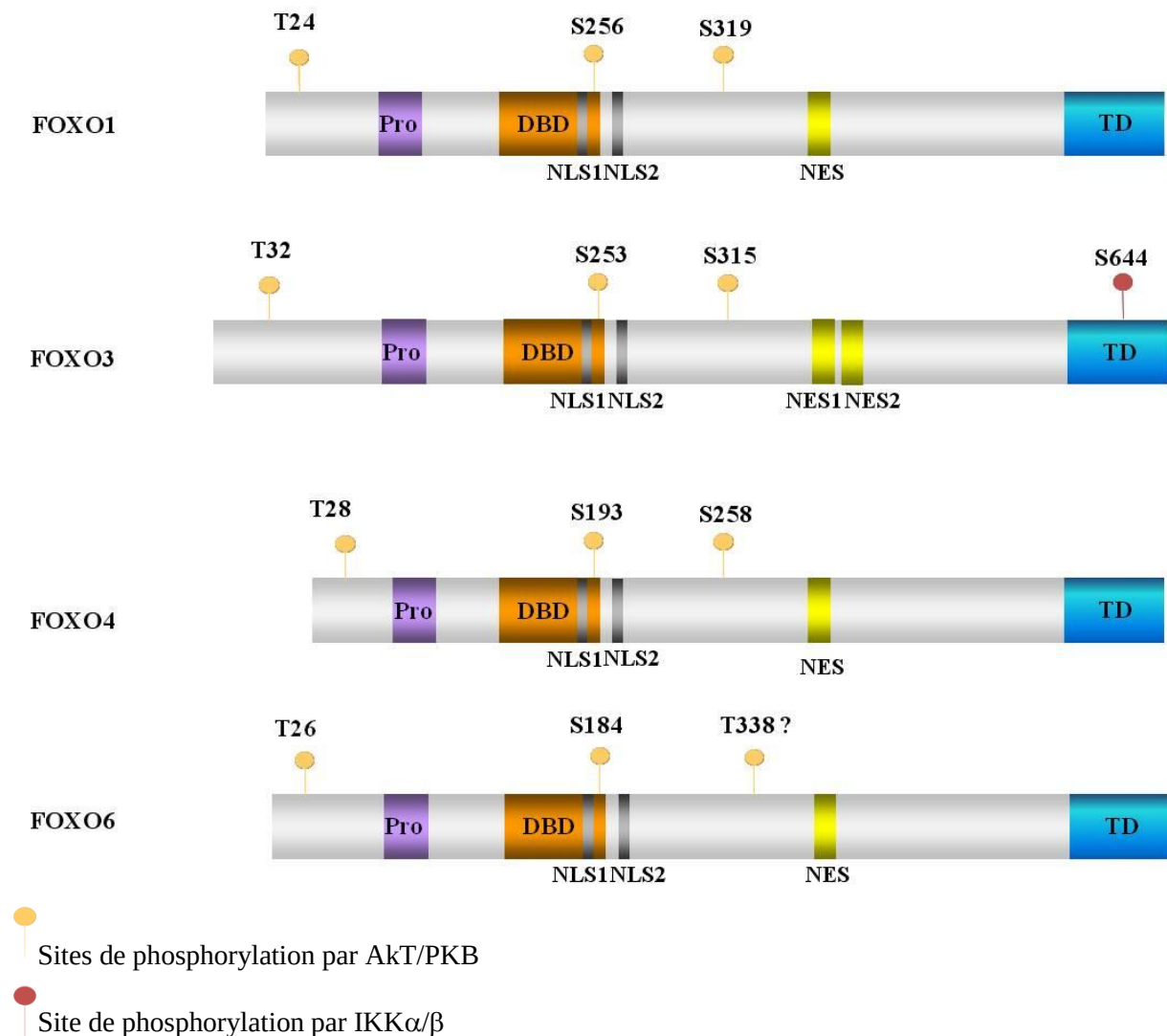


Figure 36. Représentation schématique de la structure primaire des protéines FOXO. Toutes les protéines possèdent une région riche en prolines (Pro), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), deux séquences de localisation nucléaire (NLS1 et NLS2), une séquence d'export nucléaire (NES), et un domaine de transactivation (TD). Les acides aminés phosphorylables par Akt/PKB ainsi que la sérine phosphorylable par IKKα/β sont représentés (T : Thérionine, S : Sérine).

Le domaine de liaison à l'ADN est composé d'environ 110 acides aminés, qui s'organisent en trois hélices α et trois feuillets β , créant ainsi deux boucles en forme d'ailes. Le DBD permet aux protéines FOXO de se lier à l'ADN, sous forme de monomères, sur une séquence consensus 5'-(A/C)AA(C/T)A-3', commune aux différentes protéines Forkhead, dénommée FHRE (ForkHead Responsive Element) (Obsil and Obsilova 2008). Le DBD est le domaine le plus conservé parmi les protéines FOXO.

Les domaines NES et NLS permettent l'adressage au cytoplasme ou au noyau des protéines FOXO. Le NES des molécules Forkhead, caractérisé par une séquence riche en leucines, est positionné en aval du troisième site de phosphorylation par PKB (Obsil and Obsilova 2008). Un seul NES a été identifié pour les protéines FOXO1, FOXO4 et FOXO6. Au contraire, deux NES ont été caractérisés pour la protéine FOXO3. Le NLS, localisé dans la région C-terminale du DBD, est bipartite : il est constitué de deux groupes d'acides aminés basiques séparés par un espace de composition variable. Les protéines FOXO seront donc localisées soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme, en fonction des signaux perçus par la cellule. Cette régulation sera décrite dans le paragraphe suivant (page 83).

La région riche en prolines permet, en théorie, l'interaction avec des protéines possédant un domaine SH3. Cependant, aucune étude mettant en évidence ce type d'interaction n'a été publiée à ce jour.

Le domaine de transactivation, présent dans la région C-terminale des protéines FOXO, permet l'interaction avec d'autres protéines co-activatrices. La délétion du domaine de transactivation de FOXO1 inhibe l'interaction de FOXO1 avec le co-activateur CBP (CREB-Binding Protein) et donc son activité transcriptionnelle (Nasrin *et al.*, 2000). Par ailleurs, le facteur de transcription p53 est capable de rompre l'interaction entre le domaine forkhead et le domaine de transactivation de FOXO3 en se liant au domaine de transactivation de FOXO3. Ce changement de conformation de p53 libère son NES et permet la relocalisation cytoplasmique de p53 et de FOXO3 (Wang *et al.*, 2008).

Enfin, des sites de phosphorylation conservés entre toutes les protéines de la sous-classe O de la famille forkhead ont été identifiés : une thréonine en position N-terminale (thréonine 32 de la protéine FOXO3), une sérine localisée dans le DBD (sérine 253 de la protéine FOXO3), et un résidu en amont du NES. Ce dernier résidu est une sérine dans le cas de FOXO1, FOXO3 et FOXO4, et une thréonine dans le cas de la protéine FOXO6 (figure

36). Ces différents sites sont phosphorylés par une kinase bien caractérisée : la kinase Akt/PKB (Brunet *et al.*, 1999).

D'autres kinases phosphorylent la protéine FOXO3 : IKK β phosphoryle la sérine 644, AMPK (AMP cyclique Kinase) phosphoryle les sérines 399, 413, 555, 588, et 626 (Greer *et al.*, 2007). Les sérines 294, 344 et 425 sont également phosphorylables par la kinase ERK (Yang *et al.*, 2008).

b. Régulation de l'activité des protéines FOXO

La phosphorylation est une des modifications post-traductionnelles, au même titre que l'acétylation ou la dégradation par le protéasome, qui permettent de réguler la localisation subcellulaire des protéines FOXO et par conséquent, leur activité transcriptionnelle.

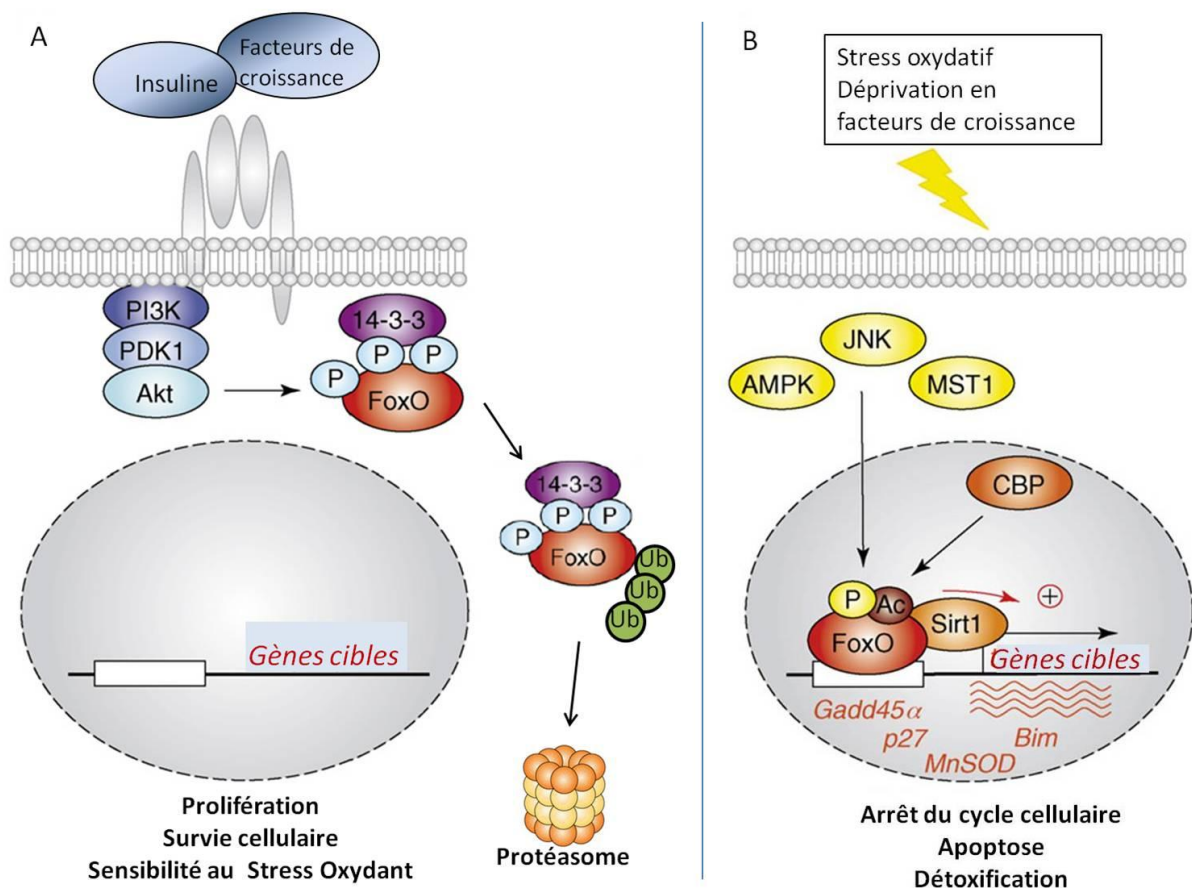


Figure 37. Représentation schématique de la régulation de la localisation subcellulaire des protéines FOXO, en présence de facteurs de croissance (A) ou dans de conditions de stress (B). Les kinases sont schématisées, les sites phosphorylés (P) et les ubiquitines (Ub) sont représentés. Les gènes cibles des FOXOs sont indiqués dans le noyau. D'après Salih *et al.* (Salih and Brunet 2008).

En réponse aux facteurs de croissance, tels que l'interleukine-2, l'interleukine-3, ou l'insuline, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) active la kinase Akt/PKB qui phosphoryle elle-même les protéines FOXO sur trois différents résidus conservés au sein de la famille (figure 37). La phosphorylation par la kinase Akt/PKB de la thréonine en position N-terminale et de la sérine présente dans le DBD crée deux motifs de liaison aux protéines chaperones 14-3-3 (Obsil and Obsilova 2008). Cette liaison induit rapidement l'export de FOXO du noyau grâce aux protéines CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) et RanGTPase (Fu and Tindall 2008). La présence de 14-3-3 pourrait masquer le NLS de la protéine FOXO, et par conséquent, inhiber l'import de FOXO dans le noyau et son activité transcriptionnelle (Salih and Brunet 2008).

Au contraire, en absence de facteurs de croissance, les facteurs FOXO ne sont pas phosphorylés par Akt/PKB. Ils migrent alors dans le noyau et se fixent à l'ADN afin d'induire la transcription de leurs gènes cibles, en se fixant sur les séquences FHRE présentes sur leur promoteur (figure 37). Lors d'un stress oxydant, d'autres enzymes peuvent phosphoryler les protéines FOXO mais également induire leur migration vers le noyau et leur activité transcriptionnelle. Ainsi, les kinases JNK (c-Jun-N-terminal kinase), ou MST1 (Mammalian Ste 20-like kinase 1), activées suite à un stress oxydant phosphorylent la sérine 207 de la protéine FOXO3, induisant alors sa translocation nucléaire et une inhibition de la liaison des FOXO aux protéines 14-3-3 (Jang *et al.*, 2007).

L'acétylation est un mécanisme qui se produit dans le noyau et qui a pour but de diminuer l'activité transcriptionnelle des FOXO. L'histone acétyltransférase CBP, en présence de son co-activateur P300, est responsable de l'acétylation de FOXO3 (Weidinger *et al.*, 2008) (figure 36). La désacétylation est réalisée par la protéine SIRT1 (Sirtuin 1) et permet alors à la protéine FOXO3 d'être de nouveau phosphorylable par Akt (Brunet *et al.*, 2004).

Enfin, la dégradation des protéines FOXO par le protéasome est un autre mécanisme de régulation de leur activité. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 256 de FOXO1 par Akt permet sa liaison à Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), une ubiquitine-ligase (Huang *et al.*, 2005). Skp2 induit ainsi la polyubiquitination et la dégradation de FOXO1 (Huang and Tindall 2011). D'autre part, FOXO3 est phosphorylée par la kinase IKK α/β sur la sérine 644, ce qui induit son ubiquitination par une autre ubiquitine-ligase (Hu *et al.*, 2004). FOXO3 peut

également être phosphorylée par ERK, conduisant à son ubiquitination par la protéine E3-ligase MDM2 (Murine Double Minute 2) (Yang *et al.*, 2008). Une autre étude a démontré que MDM2 pouvait également mono-ubiquitinyler FOXO4, provoquant sa translocation nucléaire (Brenkman *et al.*, 2008). Les protéines FOXO mono-ubiquitinylées pourraient ensuite être ubiquitinylées, soit par Skp2, soit par MDM2, quand ses taux intracellulaires sont élevés (Brenkman *et al.*, 2008; Huang and Tindall 2011). Les protéines polyubiquitinées sont donc ensuite dégradées par le protéasome.

La localisation subcellulaire des protéines FOXO régule donc leur activité transcriptionnelle. Les gènes cibles des protéines FOXO sont nombreux et participent à des processus divers, tels que la résistance au stress oxydatif, la réparation de l'ADN, le métabolisme, la progression du cycle cellulaire, la prolifération ou encore l'apoptose.

2. Mécanismes des effets pro-apoptotiques

Les protéines FOXO peuvent induire l'apoptose, en régulant les différentes voies apoptotiques. En effet, les protéines FOXO sont activées lors de la déprivation en facteurs de croissance, et induisent la transcription de leurs gènes cibles, comme décrit précédemment.

Certains gènes cibles des protéines FOXO sont *fasl* et *trail*, des ligands des récepteurs de mort.

L'expression de FasL est effectivement induite, dans les cellules fibroblastiques CCL39 déprivées en IGF1 (Insulin-Growth Factor 1) (Brunet *et al.*, 1999). Le facteur de transcription FOXO3, activé dans ces cellules, est responsable de la régulation positive de FasL. En effet, trois séquences FHRE ont été identifiées sur le promoteur du gène *fasl* (Brunet *et al.*, 1999). D'autre part, Brunet et collaborateurs ont montré que la surexpression d'un mutant non phosphorylable de FOXO3, qui est donc toujours localisé dans le noyau, active l'apoptose de cellules cultivées en présence de leur facteur de croissance, en augmentant l'expression de FasL (Brunet *et al.*, 1999).

Le ligand TRAIL a également été identifié comme un gène cible de FOXO1 et FOXO3 dans la lignée de cellules de cancer prostatique LAPC4 (Modur *et al.*, 2002). Leur surexpression augmente en effet l'apoptose de ces cellules, car les facteurs de transcription FOXO induisent la régulation positive de TRAIL en se fixant sur leurs sites consensus, caractérisés dans le promoteur du gène *trail* (Modur *et al.*, 2002).

IL-3 et la lignée de lymphocytes T murins CTLL-2 déprivée en IL-2 (Dijkers *et al.*, 2000; Stahl *et al.*, 2002). Deux éléments de réponse des facteurs FOXO fonctionnels ont été identifiés sur le promoteur de *bim* (Gilley *et al.*, 2003). Par ailleurs, FOXO3, dont l'expression est augmentée par le paclitaxel, peut également induire la transcription de *bim* et par conséquent l'apoptose d'une lignée de cellules de cancer du sein, la lignée MCF7, sensible au paclitaxel (Sunters *et al.*, 2003).

Le facteur de transcription FOXO3 interagit avec le facteur de transcription RUNX3 pour activer la transcription de *bim* dans différentes lignées cellulaires : les cellules ACS, dérivées d'un carcinome gastrique et les cellules MEF, des fibroblastes embryonnaires murins (Yamamura *et al.*, 2006). Deux éléments de réponse au facteur RUNX3 ont été identifiés sur le promoteur de *bim*. Un de ces deux sites est juxtaposé à une séquence FHRE, ce qui explique l'importance de la coopération entre FOXO3 et RUNX3. En effet, les cellules MEF déficientes en RUNX3 sont résistantes à l'apoptose induite par le facteur de transcription FOXO3 (Yamamura *et al.*, 2006).

D'autres protéines de la famille Bcl-2 sont induites par FOXO3 dans les cellules hématopoïétiques. Ainsi, l'expression de la protéine pro-apoptotique PUMA est régulée positivement dans des lymphocytes T murins activés déprivés en IL-2 et dans les cellules MEF déprivées en sérum. Une séquence FHRE a été caractérisée sur le promoteur de *puma* (You *et al.*, 2006).

La surexpression de FOXO3 dans des cellules endothéliales humaines isolées de la veine ombilicale humaine (HUVEC) induit l'expression de la protéine pro-apoptotique NOXA, en se fixant sur les séquences FHRE présentes dans son promoteur (Czymai *et al.*, 2010).

L'augmentation de l'expression de la protéine bNIP3 (Bcl-2 and 19-kD Interacting Protein-3), un autre membre de la famille Bcl-2, est également due aux protéines FOXO (Tran *et al.*, 2002).

Par ailleurs, FOXO4 est capable d'induire l'expression du régulateur transcriptionnel Bcl-6, un autre membre de la famille Bcl-2, qui inhibe l'activité de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L (Tang *et al.*, 2002).

RESULTATS

I. Objectifs du travail

Il a été démontré au sein du laboratoire que l'expression de la protéine GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) était induite dans les cellules CTLL-2, lymphocytes T murins cytotoxiques, par la déprivation en IL-2. Dans cette lignée cellulaire, la protéine GILZ a été décrite comme étant une protéine anti-apoptotique. En effet, GILZ était capable d'inhiber l'activité du facteur de transcription FOXO3, activé lors de la déprivation en IL-2, et par conséquent, la transcription de ses gènes cibles tels que *bim*, un gène pro-apoptotique (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

La protéine GILZ appartient à la famille de protéines TSC-22D (TGF- β Stimulated Clone 22 Domain). TSC-22, une autre protéine de cette même famille, présente une forte homologie de séquence avec GILZ. Cependant, aucune interaction physique ou fonctionnelle n'a été décrite entre ces protéines.

La protéine TSC-22, quant à elle, a été décrite comme ayant une activité pro-apoptotique dans plusieurs lignées cancéreuses (Hino *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008). A ce jour, aucune étude déterminant le rôle de TSC-22 dans les cellules hématopoïétiques au cours de l'apoptose n'a été publiée.

L'objectif général de ce travail était de déterminer le rôle des protéines de la famille TSC-22D au cours de l'apoptose des lymphocytes T (LT). Nous souhaitions ainsi déterminer si TSC-22 régulait l'apoptose des LT et rechercher l'existence ou non d'une coopération entre GILZ et TSC-22.

La première partie du travail a consisté à analyser le rôle de TSC-22 lors de l'apoptose de lymphocytes T déprivés en IL-2. Des clones de cellules CTLL-2 surexprimant TSC-22 ou GILZ ont ainsi été produits. Nos expériences ont permis de montrer que TSC-22, contrairement à GILZ, accélérait l'entrée en apoptose induite par la déprivation en IL-2. Nous avons également montré que, dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2, TSC-22 inhibait l'induction de l'expression de GILZ. Ces résultats font l'objet d'un article intitulé "TSC-22 increases T cell apoptosis upon interleukin-2 withdrawal through inhibition of GILZ expression and BIM down-regulation" qui a été récemment soumis au journal Apoptosis.

La deuxième partie du travail a consisté à déterminer le ou les mécanisme(s) par lequel (ou lesquels) TSC-22 régulaient la transcription de *gilz*. Premièrement, l'expression de GILZ étant induite par le facteur de transcription FOXO3, nous avons recherché si TSC-22 inhibait l'activité transcriptionnelle de ce facteur. Ainsi, des tests d'activité transcriptionnelle ont été effectués dans la lignée cellulaire HL-60, issue d'un patient atteint d'une leucémie aigüe promyélocytaire. Deuxièmement, nous avons posé la question d'une interaction entre GILZ et TSC-22, qui pourrait réguler la stabilité de ces protéines. Nous avons donc mis en évidence une interaction physique entre les protéines GILZ et TSC-22 surexprimées dans les cellules HL-60.

La dernière partie du travail présenté ici a concerné les expériences auxquelles j'ai participé, réalisées en grande majorité par Mlle Latré de Laté, et qui a fait l'objet d'une publication en 2010 dans le Journal of Biological Chemistry : « Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner » (Latre de Late *et al.*, 2010). Ce travail concernait l'effet inhibiteur de GILZ sur l'activité transcriptionnelle des facteurs Forkhead dans les cellules HL-60. Ainsi, nous avons montré que GILZ inhibait l'activité transcriptionnelle de FOXO1, FOXO3 et FOXO4. L'inhibition de l'activité du facteur FOXO3 était imputable à une relocalisation dans le cytoplasme de ce facteur, impliquant le mécanisme de transport Crm1 (Chromosomal Region Maintenance protein 1).

ARTICLE 1 :

TSC-22 increases T cell apoptosis upon interleukin-2 withdrawal through inhibition of GILZ expression and BIM down-regulation.

Aurélie Pépin, Marie-Alix Espinasse, Perle Latré de Laté, Armelle Biola-Vidamment and Marc Pallardy.

II. Article 1: TSC-22 increases T cell apoptosis upon interleukin-2 withdrawal through inhibition of GILZ expression and BIM down-regulation.

TSC-22 a été décrit dans diverses lignées cellulaires comme ayant des propriétés pro-apoptotiques (Ohta *et al.*, 1997; Hino *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008). Au sein du laboratoire, nous avons montré précédemment que GILZ, une protéine fortement homologue à TSC-22, était capable de retarder l'entrée en apoptose de la lignée cellulaire de lymphocytes T cytotoxiques CTLL-2 déprivée en interleukine-2 (IL-2) (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Nous avons donc émis l'hypothèse que TSC-22 pouvait également réguler l'apoptose des lymphocytes T et peut-être interagir avec la protéine GILZ.

Tout d'abord, nous avons analysé l'expression des ARNm de *gilz* et *tsc-22* dans divers tissus humains et lignées cellulaires hématopoïétiques afin de déterminer s'ils pouvaient être exprimés dans les mêmes cellules. TSC-22 et GILZ n'étant pas exprimés dans la lignée cellulaire CTLL-2 dépendante de l'IL-2, nous avons choisi de générer des clones stables de cette lignée surexprimant soit GILZ, soit TSC-22.

L'étude de l'apoptose des clones CTLL-2 déprivés en IL-2 a permis de montrer que TSC-22 augmentait l'apoptose des cellules par rapport aux cellules contrôles. Nous avons également montré que TSC-22 ne régulait pas l'apoptose des clones CTLL-2 induite par la dexaméthasone, ou la staurosporine, suggérant que TSC-22 régule par un mécanisme spécifique l'apoptose induite par la déprivation en IL-2.

Nous avons ensuite montré que l'apoptose induite par TSC-22 était dépendante des caspases, et que TSC-22 était capable d'augmenter l'activation des caspases-9 et -3, impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale. L'analyse de l'expression de BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death) a permis de montrer que TSC-22 régulait positivement l'expression protéique des trois isoformes (BIM EL, BIM L et BIM S) et augmentait uniquement la transcription de la forme BIM S.

Nous avions précédemment montré que l'expression de GILZ, induite au cours de la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2, permettait de diminuer l'expression de BIM (Asselin-Labat *et al.*, 2004). L'expression de BIM étant régulée positivement en présence de TSC-22, nous avons analysé l'expression de GILZ dans les clones CTLL-2 au cours de la déprivation en IL-2. Nous avons ainsi montré que l'induction de l'expression de GILZ était

nettement diminuée en présence de TSC-22. La faible expression de GILZ en présence de TSC-22 était corrélée à une diminution de l'ARNm de *gilz* au cours de la déprivation en IL-2. Nous avons en outre montré que la diminution de l'ARNm de *gilz* n'était pas due à une diminution de sa stabilité en présence de TSC-22, suggérant que TSC-22 pourrait réguler la transcription de *gilz*.

Notre travail a donc permis de montrer que TSC-22 augmente l'apoptose des lymphocytes T CTLL-2 déprivés en IL-2, en régulant négativement l'expression de la protéine anti-apoptotique GILZ.

TSC-22 increases T cell apoptosis upon interleukin-2 withdrawal through inhibition of GILZ expression and BIM down-regulation.

Aurélie Pépin, Marie-Alix Espinasse, Perle Latré de Laté, Armelle Biola-Vidamment and Marc Pallardy.

Univ Paris-Sud, INSERM UMR 996, Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay-Malabry, France.

INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 92290 Châtenay-Malabry, France.

Adress correspondance to: Marc Pallardy, INSERM UMR 996, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Phone: 33.1.46.83.54.92. Fax: 33.1.46.83.54.96. E-mail: marc.pallardy@u-psud.fr

ABSTRACT

The TSC-22 (Transforming growth factor- β Stimulated Clone 22) protein has been described as a pro-apoptotic protein in different cell lines. TSC-22 belongs to the TSC-22D (TSC-22 Domain) family of proteins, along with GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper). In T-lymphocytes, GILZ expression is induced upon IL-2 deprivation allowing cells to delay apoptosis through down-regulation of pro-apoptotic BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death) expression. The aim of this work was to elucidate the respective roles of GILZ and TSC-22 during IL-2 deprivation-induced T-lymphocytes apoptosis. We demonstrated that expression of TSC-22 in the murine lymphoid CTLL-2 cell line increased IL-2 deprivation-induced apoptosis. Upon IL-2 withdrawal, caspases-9 and -3 activities and BIM expression were up-regulated in TSC-22 expressing clones as compared to control clones, suggesting that TSC-22 could promote a mitochondrial apoptotic pathway. Interestingly, analysis of GILZ expression revealed that TSC-22 markedly decreased the previously described induction of GILZ protein upon IL-2 deprivation. In the presence of TSC-22, *gilz* mRNA expression was also significantly repressed, but *gilz* mRNA half-life was not modified. Altogether, these results suggest that, in T-cells, TSC-22 could behave as a repressor of GILZ expression, accelerating IL-2 deprivation-induced apoptosis.

KEYWORDS

TSC-22
GILZ
T-lymphocyte
Apoptosis
BIM
IL-2 deprivation

INTRODUCTION

The TSC-22D (Transforming-growth factor beta-Stimulated Clone 22 Domain) family consists of proteins which expression is regulated by four different genes (*tsc-22d1* to *tsc-22d4*) (Khoury *et al.*, 2008). TSC-22D proteins also present several isoforms representing splice variants (for example, TSC-22D1-1 and TSC-22D1-2 for the *tsc-22d1* gene) (Fiol *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 2008). TSC-22D proteins share two highly conserved domains, a TSC-box and a leucine zipper domain, allowing them to interact through homo-dimerization or hetero-dimerization (Kester *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 2008). However, it has been shown that TSC-22D proteins were not binding to specific DNA sequences (Kester *et al.*, 1999). The most studied proteins in this family are TSC-22D1-2 termed TSC-22 and TSC-22D3-2, also named GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper).

The TSC-22 protein was first isolated from murine osteoblastic cells treated with TGF- β (Shibanuma *et al.*, 1992). TSC-22 expression can be induced by hormones (dihydrotestosterone, glucocorticoids and Follicle-Stimulating Hormone), cytokines (Interleukin-1 β , IL-1 β ; Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α and Interferon- γ , IFN- γ), growth factors like Epidermal Growth Factor (EGF) or Fibroblast Growth Factor (FGF), as well as by chemicals (Phorbol Myristate Acetate, PMA ; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ agonist) (Shibanuma *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2003; Sprenger *et al.*, 2009). Conversely, TSC-22 expression is down-regulated in several cancer cell lines (Shostak *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2009). Yu *et al.* recently demonstrated that the lack of TSC-22 expression in T lymphoma and NK LGL leukemic cells was due to promoter methylation (Yu *et al.*, 2009).

Recent reports suggested that TSC-22 played a role as an apoptosis inducer in different cell types (Ohta *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008). Indeed, Ohta *et al.* and Lee *et al.* showed that TSC-22 induced apoptosis of human gastric and ovarian carcinoma cells (Ohta *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008). In SKOV-3 cells, apoptosis was inhibited by TSC-22 degradation due to the interaction between TSC-22 and the anti-apoptotic protein Fortilin (Lee *et al.*, 2008). Moreover, Hino *et al.* and Uchida *et al.* found that TSC-22 increased apoptosis upon radio- or chemotherapeutic treatment in a human salivary gland cancer cell line (Uchida *et al.*, 2000; Hino *et al.*, 2002).

GILZ was first identified in murine thymocytes as a dexamethasone-inducible protein and was shown to be mainly expressed in hematopoietic cells, such as thymocytes, T cells, B cells, mastocytes, macrophages, monocytes and dendritic cells (DC) (D'Adamio *et al.*, 1997; Ayroldi and Riccardi 2009). Cytokines, such as IL-10 or TGF- β and glucocorticoids up-regulate GILZ expression in macrophages, DCs and T-lymphocytes (Berrebi *et al.*, 2003; Asselin-Labat *et al.*, 2005; Hamdi *et al.*, 2007). GILZ has also been described as a potent anti-inflammatory protein, down-regulating

inflammatory chemokines and cytokines production in macrophages (Berrebi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Beaulieu and Morand 2011).

In the hematopoietic system, GILZ has been demonstrated to protect cells from apoptosis induced by different stimuli. GILZ expression protects thymic hybridoma cells from Activation-Induced Cell Death and also down-regulates Fas/FasL expression (D'Adamio *et al.*, 1997). Up-regulation of GILZ expression upon IL-2 deprivation delays apoptosis of T-lymphocytes, due to inhibition of BIM (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death) expression and down-regulation of FOXO3 (Forkhead box class O3) transcriptional activity (Asselin-Labat *et al.*, 2004). In this case, GILZ inhibitory effect was due to FOXO3 relocalization in the cytoplasm (Latre de Late *et al.*, 2010). However, GILZ has also been shown to regulate apoptosis of thymocytes and T lymphocytes by increasing thymocyte apoptosis through down-regulation of Bcl-XL expression (Delfino *et al.*, 2004).

Apoptosis of T-lymphocytes is a crucial event regulating adaptative immune responses. T-lymphocyte death can be induced by two major mechanisms: Activation-Induced Cell Death (AICD) or apoptosis upon cytokine withdrawal. AICD is due to the restimulation of the T Cell Receptor (TCR) and is dependent on the Fas/Fas Ligand system. Growth factor withdrawal induces the dephosphorylation of the PKB/Akt kinase, leading to FOXO3 activation and transcription of its target genes, such as *p27*, *bim* and *puma* (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) (Stahl *et al.*, 2002; You *et al.*, 2006; Bosque *et al.*, 2007; Latre de Late *et al.*, 2010). BIM and PUMA are BH3-only molecules with pro-apoptotic activities belonging to the Bcl-2 family (Giam *et al.*, 2008; Bouillet and O'Reilly 2009). Up-regulation of BIM expression alters the interactions between pro and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, within the mitochondrial membrane, leading to release of pro-apoptotic mitochondrial constituents, caspases activation and apoptotic cell death (Bouillet and O'Reilly 2009).

The objective of this work was to understand how proteins of the TSC-22D family modulate T-lymphocytes apoptosis upon cytokine withdrawal. We found that TSC-22 increased murine CTLL-2 lymphocytes apoptosis upon IL-2 deprivation. Increase of BIM expression and activation of caspases cleavage were observed, suggesting that TSC-22 induced apoptosis through the mitochondrial pathway. Moreover, in TSC-22 expressing cells, we observed that GILZ protein expression, another member of the TSC-22D family, was inhibited after IL-2 deprivation. *gilz* mRNA induction was also decreased in IL-2-deprived cells in the presence of TSC-22, suggesting a transcriptional regulation of its expression. Our results suggest that the function of the anti-apoptotic protein GILZ, which expression is induced after IL-2 withdrawal, is inhibited by TSC-22 in T-lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Recombinant human IL-2 was from Abcys (Paris, France). G418 sulfate was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Q-VD-OPH was from Biovision (Mountain View, USA). Dexamethasone, staurosporine and actinomycin D were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, USA).

Cell lines

CTLL-2, an IL-2-dependent murine cytotoxic T-cell line, was cultured in RPMI-1640 medium, containing 0.1 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, 1 % sodium pyruvate, (Fisher Scientific), 10 % fetal calf serum (Abcys), and supplemented with 50 μ M beta-mercaptoethanol (Sigma Aldrich), and 2 ng/ml recombinant human IL-2 (Abcys).

Plasmid constructs and transfections

pcDNA3-Myc and pcDNA3-Myc-GILZ constructs were previously described (Asselin-Labat *et al.*, 2004). pcDNA3-HA-TSC-22 construct was a kind gift from Dr Dubois (Gupta *et al.*, 2003). CTLL-2 cells were transfected with pcDNA3-Myc, pcDNA3-Myc-GILZ, or pcDNA3-HA-TSC-22. Transfections were performed by electroporation with the GenePulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Ten million CTLL-2 cells were electroporated in one 0.2 cm cuvette at 160V, five times (10ms spaced by 2s). Selection of stably transfected cells was initiated 48 hours after electroporation using 1 mg/ml G418 for pcDNA3 transfected cells. Cells were then cloned by limiting dilution. Clones were selected based on GILZ or TSC-22 protein expression. Control (CTRL) clones were randomly selected.

Measurement of apoptosis

Apoptosis was determined using flow cytometry by quantification of DNA hypodiploidy (subG1 peak) as previously described (Asselin-Labat *et al.*, 2004), and by quantification of Annexin-V positive cells: harvested cells were incubated with Annexin-V-PE and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences, San Jose, USA). Data acquisition was performed using the Cellquest software (BD Biosciences).

Antibodies and Western-Blot

CTLL-2 deprived cells were harvested at the indicated hours washed in PBS and lysed. For BIM, GILZ and TSC-22 immunoblots, cells were lysed in nonidet-P40 lysis buffer (Asselin-Labat *et al.*, 2004). The Laemmli buffer was used for caspase-3 and caspase-9 immunoblots (Hebert *et al.*, 2008). Western-blots were performed as previously described (Asselin-Labat *et al.*, 2004). The following antibodies were used: anti-BIM (22-40) from Calbiochem® (Merck, Darmstadt, Germany),

anti-beta-Tubulin (T4026, Sigma), anti-cleaved Caspase-3 (9661, Cell Signaling Technology, Danvers, USA), anti-Caspase-9 (9504, Cell Signaling Technology). Polyclonal antibodies against GILZ were generated as previously described (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Rabbit polyclonal antibodies against TSC-22 were generated by Eurogentec (Seraing, Belgium) according to the Speedy program (28-day), using KLH-linked-peptides as immunogens. Densitometric analysis of the blots was performed using the Image Lab™ software (Bio-Rad Laboratories).

RT-PCR analysis

mRNA from different human tissues were purchased from Clontech Laboratories (Mountain View, USA). First-strand cDNA was synthesized from total RNA extracted in RNase-free conditions. Reverse Transcription (RT) was performed on 2 µg total RNA with oligo(dT) primers (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and 2 U AMV RT (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), as described previously (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Semi-quantitative Polymerase Chain Reactions (PCR) were performed using 1.25 unit of Taq Polymerase (Qbiogene, Illkirch, France), as previously described (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Specific primers for murine *gilz* were 5'-ATGGAGGTGGCGCTCTATCA-3' and 5'-TTACACCGCAGAACCACCAG-3' and primers for murine and human *tsc-22* were 5'-ATGAAATCCCAATGGTGTAG-3' and 5'-CTATGCGGTTGATCCTGAGC-3'. Murine and human *gapdh* primers were 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. PCR products were run on agarose gels containing ethidium bromide. Densitometric analysis was performed using the Quantity One® software (Bio-Rad Laboratories).

Real-time PCR analysis

IL-2-deprived CTLL-2 cells were harvested at different times after deprivation and frozen in Trizol® (Fisher Scientific). Total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. RT was also performed as described above. Real-time PCR was carried out on a CFX-96 instrument (Bio-Rad Laboratories) using the LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Forward and reverse primers were each designed on a different exon of the target gene sequence, eliminating the possibility of amplifying genomic DNA. To confirm the specificity of the amplification, the PCR product was subjected to a melting curve analysis and agarose gel electrophoresis. PCR amplification was performed in duplicate in a total reaction volume of 10 µl. The reaction mixture consisted of 5 µl diluted template, 2 µl FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green kit, and 0.5 µM forward and reverse primers. After an 8 min activation of Taq polymerase at 95°C, amplification was proceeded for 30–45 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s, annealing at 60°C for 5 s and extension at 72°C for 9 s. Fluorescence measurements were recorded during each extension step. An additional step starting from 70 to 95°C (0.1 °C.s⁻¹) was performed to

TCTTCTCAAGCAGCTCACGA- 3' for murine *gilz*, 5'-CGTCCACCCAATGTCTGACT-3' and 5'-CGTATGGAAGCTTGCGGTTC-3' for murine *bim* s. For murine *bim* isoforms, we used 5'-CGACAGTCTCAGGAGGAACC-3' as the forward primer and 5'-CCTTCTCCATACCAGACGGA-3' as the reverse primer (Abutin *et al.*, 2009). Murine *thp* and murine *gapdh* were used as housekeeping genes. Their primers were respectively 5'-ACTTAGCTGGGAAGCCCAAC-3' and 5'-ACGGACAACCTGCGTTGATTTT-3' and 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' and 5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3'. Relative expression ratios (*bim* or *gilz* mRNA level divided by the mean of *gapdh* and *thp* mRNA level) were calculated using the standard curve method. The mean of relative expression ratios of *bim* or *gilz* for control clones and TSC-22 clones was then calculated for each experiment. Results were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of the *bim* or *gilz* mRNA level in control clones or TSC-22 clones in three independent experiments, normalized to the relative quantity of their mRNA in control clones at the beginning of the experiment (t=0).

Measurement of *gilz* mRNA half-life

CTLL-2 clones were deprived of IL-2 for 6 hours. A potent inhibitor of mRNA synthesis, Actinomycin D, dissolved in DMSO, was then added to the cells (2.5 μ g/ml final concentration). Total RNA was extracted and then subjected to RT and real-time PCR as described above, to determine the relative quantity of *gilz* mRNA. Murine *gapdh* and murine β -*actin* were used as housekeeping genes. β -*actin* primers were 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' and 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'. Results were expressed as relative expression ratios calculated using the standard curve method, and normalized to the relative expression ratio of *gilz* mRNA at the time of actinomycin D addition (hour 0) for each clone.

Linear regressions were drawn for each clone and their slope was determined. Half-life of *gilz* mRNA was then calculated.

Statistical analysis

Experiments were performed at least three times and results are presented as mean $\pm$ S.E.M. Mann-Whitney tests were used to compare pairs of means. Results were considered significant for $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with Statistica® (StatSoft, Tulsa, USA).

RESULTS

Expression of *tsc-22* and *gilz* mRNA in human tissues, and in hematopoietic cells and cell lines.

TSC-22 and GILZ are belonging to the same family of proteins and their expression can be regulated by common stimuli *ie* TGF- β . This prompted us to examine their mRNA expressions in a collection of normal human tissues and in hematopoietic cell lines. mRNA expression was measured by RT-PCR using specific primers for *gilz*, *tsc-22* or *gapdh*. *gilz* and *tsc-22* mRNAs were detected in all the tissues tested (Fig. 1). We then measured *gilz* and *tsc-22* mRNAs expression in hematopoietic cell lines. Results showed that *tsc-22* and *gilz* had similar mRNAs expression profiles (Table 1). An interesting observation is the differential expression of *gilz* and *tsc-22* mRNAs in primary monocyte and monocyte-derived dendritic cells. Moreover, it is important to note that in IL-3-dependent BaF/3 cell line, only *tsc-22* mRNA was detected whereas in IL-2-dependent cell lines (CTLL-2, NK-L, Kit-225), both *gilz* and *tsc-22* mRNAs were not detected in the presence of the cytokine. However, in IL-2-deprived cells, *gilz* mRNA was up-regulated whereas mRNA for *tsc-22* remained undetected (data not shown).

TSC-22 expression in CTLL-2 cells increased apoptosis upon IL-2 deprivation.

GILZ has been previously described as an inhibitor of IL-2 deprivation-induced apoptosis in CTLL-2 cells (Asselin-Labat *et al.*, 2004). To evaluate whether TSC-22 could affect this type of cell death, CTLL-2 cells were stably transfected with expression vectors for *tsc-22*, *gilz* or the control vector. Expression of GILZ or TSC-22 in the selected clones is shown in figure 2A. It is important to note that our antibodies directed against GILZ and TSC-22 are specific and don't recognize the other TSC-22D proteins. Apoptosis of IL-2-deprived cells was measured using two methods: quantification of hypodiploid cells (SubG1) and quantification of cells with externalized phosphatidylserine. The level of apoptosis of TSC-22-expressing cells was significantly increased compared to control clones when measuring cells in SubG1 (Fig. 2B). As demonstrated before, GILZ overexpression decreased apoptosis of IL-2-deprived cells, compared to control clones, as measured using the SubG1 method (Fig. 2B). Results were confirmed using quantification of Annexin-V and 7-AAD positive cells showing that TSC-22 overexpression increased the number of apoptotic cells compared to control clones (Fig. 2C).

Apoptosis induced by staurosporine or dexamethasone was not modified by TSC-22 overexpression in CTLL-2 cells.

To determine whether the effect of TSC-22 on IL-2 deprivation-induced apoptosis was specific for this stimulus, we treated CTLL-2 clones with dexamethasone or staurosporine. Apoptosis of TSC-22 expressing clones, determined using the SubG1 technique, was not different from apoptosis of control

clones (Fig. 3A). Quantification of apoptotic cells treated with staurosporine was performed using Annexin-V and 7-AAD staining. Results showed no difference between the number of apoptotic cells in TSC-22 clones compared to control clones (Fig. 3B). These results suggested that the increase of apoptosis promoted by TSC-22 was specific of the IL-2-deprivation stimulus.

Apoptosis induced by TSC-22 was caspases-dependent and implicated the mitochondrion.

In ovarian carcinoma cells, TSC-22 has been shown to induce apoptosis through activation of caspase-3 (Lee *et al.*, 2008). Pretreatment of TSC-22 expressing clones and control clones with QVD-OPH, an irreversible inhibitor of caspases activity, showed a significant inhibition of apoptosis in both TSC-22 and control clones (Fig 4A). These results suggested that TSC-22-induced apoptosis was caspases-dependent.

We then analyzed caspase-9 and caspase-3 activation by Western-Blot. Pro-caspase-9 is known to be cleaved in caspase-9, leading to pro-caspase-3 cleavage, caspase-3 activation and apoptosis. First, pro-caspase-9 is cleaved during the assembly of the apoptosome, leading to production of p39, able to activate caspase-3 by proteolytic cleavage of its proform at Asp¹⁷⁵. Activated caspase-3 is then capable of feedback cleavage of caspase-9 at Asp³³⁰, producing the p37 subunit, resulting in an increase in apoptosome activity (Zou *et al.*, 2003). Results showed that both caspase-9 and caspase-3 were activated in control cells upon IL-2 deprivation (Fig. 4B). In the presence of TSC-22, caspases cleavage was more rapid and pronounced compared to control clones. Indeed, we observed the successive cleavage of pro-caspase-9 in p39 and p37 subunits, simultaneously with the appearance of activated caspase-3 forms (Fig. 4B). These results suggested that TSC-22 expression was able to accelerate the kinetic of apoptosis due to IL-2 deprivation.

Another interesting observation was the spontaneous apoptosis of TSC-22 expressing cells, even in the presence of IL-2. Indeed, the percentage of apoptotic TSC-22 clones was higher than that of control clones (Fig. 4C), and caspase-3 was slightly activated in TSC-22 clones compared to control clones (Fig. 4D). These results suggested that below a certain IL-2 level, TSC-22 accelerated apoptosis of CTLL-2 cells.

TSC-22 increased BIM expression upon IL-2 deprivation.

IL-2 deprivation of CTLL-2 cells results in up-regulation of the pro-apoptotic protein BIM expression (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Moreover, GILZ is able to decrease BIM expression in these conditions, and as a consequence delays apoptosis (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Here, we showed that TSC-22 expression increased apoptosis of IL-2-deprived cells. We then analyzed BIM expression upon IL-2 deprivation in TSC-22 expressing CTLL-2 clones. Three isoforms of BIM are well described: Extra-long (EL), Long (L) and Short (S). Their expression is regulated by transcriptional or post-translational mechanisms. BIM EL and L isoforms are constitutively expressed in CTLL-2 cells, and linked to dynein-light chain proteins when phosphorylated. BIM S has been described as the most

potent pro-apoptotic isoform and its expression is augmented during apoptosis through gene transcription.

Using an antibody recognizing the three isoforms of BIM, we determined BIM expression by Western-Blot. As previously shown, GILZ expression decreased BIM levels in IL-2-deprived CTLL-2 clones (Fig. 5A). Our results showed that upon IL-2 deprivation, BIM expression was higher in TSC-22 expressing clones as compared to control clones (Fig. 5A). We then determined by real-time RT-PCR experiments the expression of *bim* mRNA isoforms using two different primer pairs. The first primer pair recognizes the three *bim* mRNA isoforms (Fig. 5B), whereas the second one was specific for *bim s* mRNA (Fig. 5C). Total *bim* mRNAs expression was induced both in control clones and in TSC-22 clones. Relative quantity of *bim* mRNAs was higher in TSC-22 clones than in control clones at 4 hours and 12 hours after IL-2 withdrawal, with a significant difference at 12 hours (Fig. 5B). The induction of *bim s* mRNA expression was significantly increased in control clones until 8 hours after IL-2 deprivation and decreased between 8 and 12 hours (Fig. 5C). However, in TSC-22 clones, *bim s* mRNA expression was significantly higher than in control clones, at 4 hours and 12 hours upon IL-2 deprivation (Fig. 5C). This result demonstrated that *bim s* transcription in the presence of TSC-22 was persisting until 12 hours after IL-2 deprivation, suggesting that TSC-22 modified the kinetic of *bim* transcription and that TSC-22 mostly regulated BIM expression by transcriptional mechanisms.

TSC-22 decreased GILZ expression induced upon IL-2 deprivation.

GILZ is induced upon IL-2 withdrawal in CTLL-2 cells leading to down-regulation of BIM expression (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Analysis of GILZ expression was first performed by western-blot experiments (Fig. 6A). Results showed that in the presence of TSC-22, GILZ expression was not up-regulated upon IL-2 deprivation compared to control clones. This effect was observed for all the times tested. We then measured *gilz* mRNA expression using real-time RT-PCR experiments (Fig. 6B). Upon IL-2 deprivation, *gilz* mRNA expression was significantly induced in CTLL-2 control clones (Fig. 6B). However, in the presence of TSC-22, *gilz* mRNA expression was slightly induced upon IL-2 deprivation. The difference of *gilz* mRNA quantity was statistically significant for all the times tested (Fig. 6B). Thus, TSC-22 was able to inhibit GILZ expression in CTLL-2 cells through down-regulation of *gilz* mRNA expression.

TSC-22 down-regulated *gilz* mRNA without decreasing its mRNA half-life.

Modification of the stability of *gilz* mRNA could be one possible mechanism responsible for the decrease of *gilz* mRNA level in the presence of TSC-22. We then evaluated *gilz* mRNA half-life in TSC-22 expressing clones in comparison to control clones, using an inhibitor of transcription, actinomycin D (Fig. 7A). RT-PCR experiments were performed as previously described. We used *gapdh* and β -*actin* as housekeeping genes, since *thp* mRNA has a very short half-life. Half-life of *gilz*

mRNA was also calculated for each clone (Fig. 7B). Results showed that TSC-22 expression didn't modify the half-life of *gilz* mRNA, compared to the half-life measured in control clones. This observation suggested that the decrease of *gilz* mRNA expression in the presence of TSC-22 was not due to a destabilization of its mRNA.

DISCUSSION

TSC-22 has been described in several cancer cell lines as a protein with pro-apoptotic properties (Ohta *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008). TSC-22 belongs to the family of TSC-22D proteins, composed of proteins with high homology, such as GILZ. GILZ expression is induced by glucocorticoids in hematopoietic cells and is also up-regulated in T-lymphocytes upon growth factor deprivation (Asselin-Labat *et al.*, 2004). In T-cells, we showed that GILZ was able to delay apoptosis upon IL-2 deprivation by down-regulating BIM expression (Asselin-Labat *et al.*, 2004). We hypothesized that proteins of the TSC-22D family could regulate the mechanism of IL-2-induced apoptosis and we focused our interest on the interplay between TSC-22 and GILZ in IL-2 deprivation-induced T-lymphocyte apoptosis.

Although the expression of *tsc-22* and *gilz* mRNAs has been demonstrated in different murine and human tissues, no study concerning the presence of both mRNAs in the same organ has been performed (Shibanuma *et al.*, 1992; Jay *et al.*, 1996; D'Adamio *et al.*, 1997). We analyzed their expression by RT-PCR experiments in several healthy human tissues. Our results showed that *tsc-22* and *gilz* mRNA were both present in all the tissues tested, including the thymus and the spleen. We were also interested to determine the cellular distribution of *tsc-22* and *gilz* mRNA in the hematopoietic tissue. *tsc-22* and *gilz* mRNAs were detected in most of the tested primary cells and the tested cell lines. However, they were not detected in IL-2-dependent cell lines, such as Kit-225, NK-L and CTLL-2. This differential expression between cell lines and primary T-cells suggests that GILZ and/or TSC-22 expression could be regulated by IL-2. Moreover, the induction of GILZ expression in T-cells upon IL-2 deprivation highlights the fact that TSC-22D proteins could participate to apoptosis induced by this stimulus. This observation points out the interest to study the role of TSC-22 and GILZ in T-lymphocyte apoptosis.

Therefore, we decided to use as a model the CTLL-2 cell line, an IL-2-dependent murine cytotoxic cell line, used in precedent works of our group (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Asselin-Labat *et al.*, 2005). We then produced stably transfected clones of CTLL-2 over-expressing TSC-22 or GILZ.

We first showed that TSC-22 protein expression increased apoptosis of IL-2-deprived T-cells. Indeed, apoptosis of CTLL-2 clones upon IL-2 deprivation was significantly higher in TSC-22 clones than in control clones, as measured by two different techniques. These results confirmed those previously published in other models, demonstrating that TSC-22 was pro-apoptotic in different cancer cell lines (Ohta *et al.*, 1997; Hino *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008). However, TSC-22 expression didn't alter apoptosis induced by dexamethasone or staurosporine, suggesting a specific role for TSC-22 in T-lymphocyte apoptosis induced by IL-2 deprivation.

Apoptotic pathways involved in T-lymphocyte apoptosis upon growth-factor deprivation are well identified (Strasser and Pellegrini 2004; Bouillet and O'Reilly 2009). Upon IL-2 withdrawal, the transcription factor FOXO3 is activated and is able to induce transcription of its target genes, such as

bim (Stahl *et al.*, 2002). Then, BIM, a pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family, modifies the balance between anti- and pro-apoptotic proteins within the membrane of the mitochondrion, leading to activation of caspase-9 and then caspase-3. The results obtained with QVD-OPH, an inhibitor of caspases activity, showed that TSC-22-induced apoptosis in CTLL-2 clones was mediated through caspases activation. Our experiments also confirmed the involvement of caspase-9 and caspase-3 in IL-2-deprived CTLL-2 control clones, as previously reported (Cornelis *et al.*, 2005). Moreover, TSC-22 expression in CTLL-2 clones was able to increase the cleavage of caspases-9 and -3, suggesting that TSC-22 accelerated apoptosis induced by IL-2 deprivation *via* an up-regulation of the mitochondrial pathway of apoptosis. The results obtained here confirmed a precedent report describing TSC-22 as a pro-apoptotic protein able to activate caspase-3 in both a human gastric carcinoma cell line and in a human ovarian carcinoma cell line (Ohta *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008).

The expression of the three isoforms of BIM has been described to be up-regulated in IL-2-deprived CTLL-2 cells, *via* post-translational and transcriptional mechanisms (Stahl *et al.*, 2002; Strasser and Pellegrini 2004). In the present study, we observed that the expression of the three BIM isoforms was up-regulated in control clones upon IL-2-deprivation, and their expression was more important in TSC-22 over-expressing clones compared to control clones. Furthermore, we analyzed *bim* mRNA expression to determine if TSC-22 was able to regulate *bim* transcription. Real-time PCR experiments performed with primers specific for the three isoforms of *bim* showed no statistical differences between the quantities of total *bim* mRNA in TSC-22 and control clones. However, analysis of *bim s* mRNA expression using specific primers demonstrated that TSC-22 was able to increase the induction of *bim s* mRNA in IL-2-deprived clones, compared to control clones. These experiments highlighted that the increase of expression of the three BIM isoforms was up-regulated by TSC-22. BIM S expression was transcriptionnally induced, whereas BIM EL and BIM L expressions could be augmented through post-translational mechanism. The ERK kinase (Extracellular signal-Regulated Kinase) is able to phosphorylate BIM EL, leading to its degradation through the proteasome pathway, in CCL39 fibroblastic cells (Ley *et al.*, 2003). In these cells, upon serum-withdrawal, ERK activity is down-regulated leading to up-regulation of BIM EL expression (Ley *et al.*, 2003). We could then hypothesize that in IL-2-deprived CTLL-2 cells, up-regulation of BIM EL and L expression was due to a decrease of their degradation and not to an induction of their transcription.

We previously reported that expression of the GILZ protein was induced in IL-2-deprived CTLL-2 cells through FOXO3-dependent mechanisms and was able to down-regulate BIM expression and to delay apoptosis (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Consequently, to determine how TSC-22 increased apoptosis induced upon IL-2 deprivation, we analyzed GILZ expression, another protein of the TSC-22D family. In the presence of TSC-22 and upon IL-2 deprivation, the induction of the GILZ protein was lower than in control clones. Analysis of *gilz* mRNA expression revealed that its mRNA was also less expressed in the presence of TSC-22, suggesting that TSC-22 could regulate *gilz* mRNA expression. One way to modulate mRNA expression is to decrease its stability. The study of *gilz*

mRNA half-life in IL-2-deprived CTLL-2 clones showed that it was varying between 2 and 2.5 hours for TSC-22 and control clones, demonstrating that TSC-22 didn't regulate the stability of *gilz* mRNA.

In conclusion, we reported here for the first time an interplay between two proteins of the TSC-22D family in T-lymphocytes. GILZ and TSC-22 were previously described as apoptosis regulators in different cell models (Uchida *et al.*, 2000; Asselin-Labat *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008). TSC-22-induced increase of apoptosis was characterized by an increase of BIM expression, and an increase of caspase-9 and caspase-3 activation. Moreover, we observed that GILZ expression, induced upon IL-2 deprivation, was down-regulated in the presence of TSC-22, suggesting that the pro-apoptotic activity of TSC-22 was mediated through GILZ down-regulation.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Expression of *tsc-22* and *gilz* mRNAs in normal human tissues. Human mRNA from pool of tissues of different healthy donors (Clontech) were used to perform RT-PCR with specific primers for *tsc-22*, *gilz* or *gapdh*. *tsc-22* and *gilz* expression were quantified by densitometric analysis and normalized to the densitometric value of *gapdh* (ratio *tsc-22/gapdh* or *gilz/gapdh*).

Table 1. Expression of *tsc-22* and *gilz* mRNAs in hematopoietic cells and cell lines. Total RNA from human and murine cell lines were extracted and used to perform RT-PCR. + means that mRNA was expressed and – means that mRNA was not expressed. (*) means that mRNA is induced after cytokine deprivation.

Figure 2. TSC-22 expression increases apoptosis in murine T-lymphocytes. (A) Expression of GILZ and TSC-22 in CTLL-2 clones in the presence of IL-2. Western-blot were performed using polyclonal anti-GILZ or anti-TSC-22 antibodies. Membranes were stripped and reblotted with an anti- β -tubulin antibody as a loading control. (B) Apoptosis of CTLL-2 cells in TSC-22 clones quantified using the SubG1 method. Cells were deprived of IL-2, cultured in the absence of IL-2, and fixed with ethanol at the indicated times. Cells were then stained with propidium iodide, and analyzed for DNA hypodiploidy using flow cytometry. One representative experiment out of three independent experiments. (C) Apoptosis of CTLL-2 cells in TSC-22 clones quantified using the Annexin-V/7-AAD method. Cells were deprived of IL-2, cultured without IL-2, and harvested at the indicated times. Cells were stained with Annexin-V and 7-AAD and analyzed using flow cytometry. Results of a representative experiment out of three is shown.

Figure 3. Dexamethasone or staurosporine-induced apoptosis are not modified by TSC-22 overexpression. (A) Cells were deprived of IL-2 and cultured without IL-2 in the presence of dexamethasone (Dex) 10^{-7} M and fixed with ethanol for the indicated times. Cells were then stained with propidium iodide, and analyzed for DNA hypodiploidy using flow cytometry. One representative experiment out of two independent experiments is shown. (B) Cells were deprived of IL-2 and cultured without IL-2 and in the presence of staurosporine (STS) 100nM or DMSO and harvested at the indicated times. Cells were then stained with Annexin-V and 7-AAD and analyzed using flow cytometry. Results of a representative experiment out of two is shown.

Figure 4. TSC-22-induced apoptosis in CTLL-2 cells is caspases-dependent. (A) Apoptosis of CTLL-2 clones in the presence of a caspase inhibitor. Cells were deprived of IL-2, cultured without IL-2 in the presence of QVD-OPH (100 μ M) or DMSO and then fixed with ethanol at the indicated times. Cells were then stained with propidium iodide, and analyzed for DNA hypodiploidy using flow cytometry. (B) Expression of caspase-9 and caspase-3 in CTLL-2 clones upon IL-2 deprivation. Cells

were deprived of IL-2, cultured in the absence of IL-2 and harvested at the indicated times. Western-blots were performed using anti-caspase-9 and anti-caspase-3 antibodies. The polyclonal antibody against caspase-9 recognized pro-caspase-9 and the two activated forms of caspase-9, whereas the antibody against caspase-3 recognized only the two activated forms of caspase-3. Membranes were stripped and reblotted with anti- β -tubulin antibody, used as a loading control. Pro-caspase-9, the two forms of caspase-9, and the two forms of caspase-3 expressions were quantified by densitometric analysis and normalized to the densitometric value of β -tubulin. (C) Percentage of apoptotic cells in control and TSC-22 clones in the presence of IL-2. Cells in culture were harvested, fixed with ethanol and stained with propidium iodide. Cells were then analyzed for DNA hypodiploidy using flow cytometry. Numbers represent the mean of the percentage of apoptotic cells in each clone from three independent experiments. (D) Caspase-3 expression in control and TSC-22 clones in the presence of IL-2. Cells in culture were harvested and western-blots were performed using anti-caspase-3 antibody. The membrane was stripped and reblotted with anti- β -tubulin antibody, used as a loading control.

Figure 5. BIM expression is up-regulated in TSC-22-overexpressing CTLL-2 clones. (A) Expression of BIM in IL-2-deprived CTLL-2 cells. Cells were deprived of IL-2, cultured without IL-2 and harvested at the indicated times. Western-blots were performed using anti-BIM antibody. A longer exposure for each experiment was shown at the bottom of the figure. Membranes were stripped and reblotted with anti- β -tubulin antibody, used as a loading control. One representative experiment out of three independent experiments is shown. Bim isoforms expression were quantified by densitometric analysis and normalized to the densitometric value of β -tubulin (ratio BIM/ β -tubulin). (B and C) Expression of *bim* mRNA in CTLL-2 clones. Clones over-expressing TSC-22 and control clones were deprived of IL-2, cultured without IL-2 and harvested at the indicated times. Total RNA was extracted and used for RT and real-time PCR with specific primers for the three *bim* isoforms (B) or only for *bim s* (C). Real-time RT-PCR was also performed using specific primers for the housekeeping genes, *tbp* and *gapdh*. Relative expression ratios of *bim* or *bim s* RNA for each condition were calculated as follows: *bim* or *bim s* level divided by the mean of *gapdh* and *tbp* level. The mean of relative expression ratios of *bim* or *bim s* for control clones (CTRL 10, 13, 21, 47) and TSC-22 clones (TSC-22 4, 5, 16, 17) was then calculated for each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of the *bim* or *bim s* mRNA level in control clones or TSC-22 clones normalized to the relative quantity of *bim* or *bim s* mRNA in control clones at the beginning of the experiment (t=0) (n=3 independent experiments). Statistical tests were performed according Mann-Whitney U tests and differences were considered as significant for p values < 0.05 (n=3 independent experiments). * correspond to significant differences between control and TSC-22 clones at 0, 4, 8 or 12 hours after IL-2 deprivation; # correspond to significant differences in control or TSC-22 clones compared to their respective value at t0; $\diamond$ correspond to significant differences between two different hours for control or TSC-22 clones.

Figure 6. GILZ expression is down-regulated in TSC-22 over-expressing CTLL-2 clones. (A) Expression of the protein GILZ in IL-2-deprived CTLL-2 clones. Cells were deprived of IL-2, cultured without IL-2 and harvested at the indicated times. Western-blot analysis was performed using anti-GILZ antibody. Membranes were stripped and reblotted with anti- β -tubulin antibody, used as a loading control. One representative experiment out of three independent experiments is shown. GILZ expression was quantified by densitometric analysis and normalized to the densitometric value of β -tubulin (ratio GILZ/ β -tubulin). (B) Expression of *gilz* mRNA in CTLL-2 clones. Clones over-expressing TSC-22 and control clones were deprived of IL-2, cultured without IL-2 and harvested at the indicated times. Total RNA was extracted and used for RT and real-time PCR using specific primers for *gilz*, and for the housekeeping genes *tbp* and *gapdh*. Relative quantities of *gilz* mRNA for each condition were calculated as follows: *gilz* level divided by the mean of *gapdh* and *tbp* level. The mean of relative expression ratios of *gilz* for control clones (CTRL 10, 13, 21, 47) and TSC-22 clones (TSC-22 4, 5, 16, 17) was then calculated for each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. of the *gilz* mRNA level in control clones or TSC-22 clones normalized to the relative quantity of *gilz* mRNA in control clones at the beginning of the experiment (t=0) (n=3 independent experiments). Statistical tests were performed according Mann-Whitney U tests and differences were considered as significant for p values < 0.05 (n=3 independent experiments). * correspond to significant differences between control and TSC-22 clones at 0, 4, 8 or 12 hours after IL-2 deprivation; # correspond to significant differences in control or TSC-22 clones compared to their respective value at t0.

Figure 7. The down-regulation of *gilz* mRNA expression by TSC-22 is not due to a decrease of its mRNA half-life. (A) Decay of *gilz* mRNA in CTLL-2 clones. Clones expressing TSC-22 and control clones were deprived of IL-2 and cultured without IL-2 for 6 hours. Cells were then treated with actinomycin D (2.5 μ g/ml) for 3 hours and harvested each hour. Total RNA was extracted and used for RT and real-time PCR using specific primers for *gilz*, and for the housekeeping genes *β -actin* and *gapdh*. Results of *gilz* mRNA expression for each clone were expressed as the relative expression ratio (relative expression ratio: *gilz* level divided by the mean of *gapdh* and *β -actin* level) normalized to the relative expression ratio at the time of addition of actinomycin D (hour 0). Linear regressions were drawn for each clone. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of linear regressions of three independent experiments performed for each clone. (B) Mean of half-life $\pm$ S.E.M. of *gilz* mRNA in TSC-22 and control clones. Linear regressions were drawn, slopes were determined and half-lives were calculated.

REFERENCES

1. Khoury CM, Yang Z, Li XY, Vignali M, Fields S, Greenwood MT (2008) A TSC22-like motif defines a novel antiapoptotic protein family. *FEMS Yeast Res* 8 (4):540-563. doi:FYR367 [pii] 10.1111/j.1567-1364.2008.00367.x
2. Fiol DF, Mak SK, Kultz D (2007) Specific TSC22 domain transcripts are hypertonically induced and alternatively spliced to protect mouse kidney cells during osmotic stress. *FEBS J* 274 (1):109-124. doi:EJB5569 [pii] 10.1111/j.1742-4658.2006.05569.x
3. Di Marco B, Massetti M, Bruscoli S, Macchiarulo A, Di Virgilio R, Velardi E, Donato V, Migliorati G, Riccardi C (2007) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 35 (2):517-528. doi:gkl1080 [pii] 10.1093/nar/gkl1080
4. Kester HA, Blanchetot C, den Hertog J, van der Saag PT, van der Burg B (1999) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *The Journal of biological chemistry* 274 (39):27439-27447
5. Shibamura M, Kuroki T, Nose K (1992) Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors. *The Journal of biological chemistry* 267 (15):10219-10224
6. Ohta S, Shimekake Y, Nagata K (1996) Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter. *Eur J Biochem* 242 (3):460-466
7. Gupta RA, Sarraf P, Brockman JA, Shappell SB, Raftery LA, Willson TM, DuBois RN (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22. *The Journal of biological chemistry* 278 (9):7431-7438
8. Sprenger CC, Haugk K, Sun S, Coleman I, Nelson PS, Vessella RL, Ludwig DL, Wu JD, Plymate SR (2009) Transforming Growth Factor- β -Stimulated Clone-22 Is an Androgen-Regulated Gene That Enhances Apoptosis in Prostate Cancer following Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Inhibition. *Clin Cancer Res* 15 (24):7634-7641. doi:1078-0432.CCR-09-0264 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-09-0264
9. Shostak KO, Dmitrenko VV, Garifulin OM, Rozumenko VD, Khomenko OV, Zozulya YA, Zehetner G, Kavsan VM (2003) Downregulation of putative tumor suppressor gene TSC-22 in human brain tumors. *J Surg Oncol* 82 (1):57-64. doi:10.1002/jso.10180
10. Yu J, Ershler M, Yu L, Wei M, Hackanson B, Yokohama A, Mitsui T, Liu C, Mao H, Liu S, Liu Z, Trotta R, Liu CG, Liu X, Huang K, Visser J, Marcucci G, Plass C, Belyavsky AV, Caligiuri MA (2009) TSC-22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 113 (22):5558-5567. doi:blood-2009-02-205732 [pii] 10.1182/blood-2009-02-205732
11. Lee JH, Rho SB, Park SY, Chun T (2008) Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22. *FEBS Lett* 582 (8):1210-1218. doi:S0014-5793(08)00171-3 [pii] 10.1016/j.febslet.2008.01.066
12. Ohta S, Yanagihara K, Nagata K (1997) Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor beta. *Biochem J* 324 (Pt 3):777-782
13. Hino S, Kawamata H, Omotehara F, Uchida D, Miwa Y, Begum NM, Yoshida H, Sato M, Fujimori T (2002) Cytoplasmic TSC-22 (transforming growth factor-beta-stimulated clone-22) markedly enhances the radiation sensitivity of salivary gland cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 292 (4):957-963. doi:10.1006/bbrc.2002.6776 S0006291X02967768 [pii]
14. Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Miwa Y, Hino S, Begum NM, Yoshida H, Sato M (2000)

Over-expression of TSC-22 (TGF-beta stimulated clone-22) markedly enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in a human salivary gland cancer cell line. *Lab Invest* 80 (6):955-963

15. Ayroldi E, Riccardi C (2009) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 23 (11):3649-3658. doi:fj.09-134684 [pii] 10.1096/fj.09-134684

16. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, Cannarile L, Migliorati G, Riccardi C (1997) A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7 (6):803-812. doi:S1074-7613(00)80398-2 [pii]

17. Hamdi H, Godot V, Maillot MC, Prejean MV, Cohen N, Krzysiek R, Lemoine FM, Zou W, Emilie D (2007) Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110 (1):211-219. doi:blood-2006-10-052506 [pii] 10.1182/blood-2006-10-052506

18. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, Maillot MC, Portier A, Couderc J, Galanaud P, Peuchmaur M, Riccardi C, Emilie D (2003) Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101 (2):729-738. doi:10.1182/blood-2002-02-0538 2002-02-0538 [pii]

19. Asselin-Labat ML, Biola-Vidamment A, Kerbrat S, Lombes M, Bertoglio J, Pallardy M (2005) FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Mol Endocrinol* 19 (7):1752-1764

20. Beaulieu E, Morand EF (2011) Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis. *Nature reviews*

21. Yang N, Zhang W, Shi XM (2008) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. *J Cell Biochem* 103 (6):1760-1771. doi:10.1002/jcb.21562

22. Asselin-Labat ML, David M, Biola-Vidamment A, Lecoeuche D, Zennaro MC, Bertoglio J, Pallardy M (2004) GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104 (1):215-223

23. Latre de Late P, Pepin A, Assaf-Vandecasteele H, Espinasse C, Nicolas V, Asselin-Labat ML, Bertoglio J, Pallardy M, Biola-Vidamment A (2010) Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* 285 (8):5594-5605. doi:M109.068346 [pii] 10.1074/jbc.M109.068346

24. Delfino DV, Agostini M, Spinicelli S, Vito P, Riccardi C (2004) Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* 104 (13):4134-4141. doi:10.1182/blood-2004-03-0920 2004-03-0920 [pii]

25. Bosque A, Marzo I, Naval J, Anel A (2007) Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss. *Mol Immunol* 44 (6):1446-1453

26. Stahl M, Dijkers PF, Kops GJ, Lens SM, Coffey PJ, Burgering BM, Medema RH (2002) The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168 (10):5024-5031

27. You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW (2006) FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med* 203 (7):1657-1663. doi:jem.20060353 [pii] 10.1084/jem.20060353

28. Giam M, Huang DC, Bouillet P (2008) BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* 27 Suppl 1:S128-136. doi:onc200950 [pii] 10.1038/onc.2009.50

29. Bouillet P, O'Reilly LA (2009) CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 9 (7):514-519. doi:nri2570 [pii] 10.1038/nri2570

30. Hebert M, Potin S, Sebbagh M, Bertoglio J, Breard J, Hamelin J (2008) Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells. *J Immunol* 181 (9):5963-5973
31. Abutin RM, Chen J, Lung TK, Lloyd JA, Sawyer ST, Harada H (2009) Erythropoietin-induced phosphorylation/degradation of BIM contributes to survival of erythroid cells. *Exp Hematol* 37 (2):151-158. doi:S0301-472X(08)00482-7 [pii]
10.1016/j.exphem.2008.10.008
32. Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik SW, Wu JC, Tomaselli KJ, Armstrong RC (2003) Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *The Journal of biological chemistry* 278 (10):8091-8098
33. Jay P, Ji JW, Marsollier C, Taviaux S, Berge-LeFranc JL, Berta P (1996) Cloning of the human homologue of the TGF beta-stimulated clone 22 gene. *Biochemical and biophysical research communications* 222 (3):821-826
34. Strasser A, Pellegrini M (2004) T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends in immunology* 25 (11):610-615
35. Cornelis S, Bruynooghe Y, Van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P, Beyaert R (2005) Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1. *Oncogene* 24 (9):1552-1562
36. Ley R, Balmain K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *The Journal of biological chemistry* 278 (21):18811-18816

Figure 1

	Adrenal gland	Bone Marrow	Brain (cerebellum)	Brain (whole)	Heart	Kidney	Liver	Lung (whole)	Salivary gland	Skeletal muscle	Thymus	Thyroid gland	Trachea	Spinal cord	Spleen	Fetal brain	Fetal liver	Placenta	Prostate	Testis	Uterus
<i>tsc-22</i>																					
<i>tsc-22/gapdh</i>	1,2	0,6	1	1	0,8	0,7	0,6	1,2	0,9	0,4	0,9	1	1	0,8	0,7	1,4	0,8	1,6	2,3	1,3	1,7
<i>gilz</i>																					
<i>gilz/gapdh</i>	1,2	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	1	1	0,7	1,2	1,6	1,6	1,1	1,8	0,9	1	1,3	2,2	0,9	1,6
<i>gapdh</i>																					

Table 1

Cell type		<i>gilz</i> mRNA	<i>tsc-22</i> mRNA
T cells	Murine primary T cells	+	+
	D10.G4.1	+	+
	CTLL-2	- (*)	-
	Human primary T cells	+	+
	Jurkat	+	+
	Kit 225	- (*)	-
Natural Killer	NKL	- (*)	-
B cells	BaF/3	- (*)	+
	BL41	+	+
	Ramos	+	+
	JY	+	+
Promyelocyte	HL60	-	+
Dendritic cells (DC)	CD34-DC	+	+
	Mo-DC	+	-
Monocytes	Primary monocytes	-	+
	U937	+	+

Figure 2

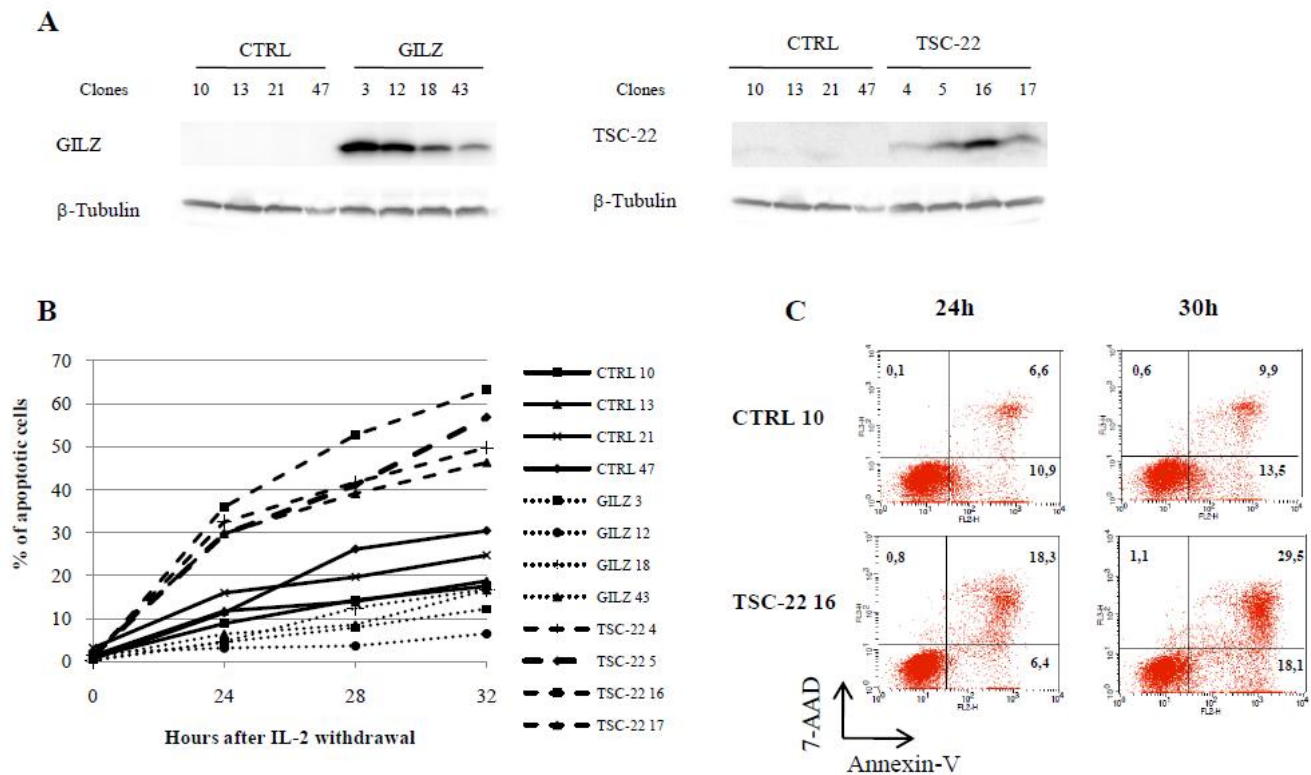


Figure 3

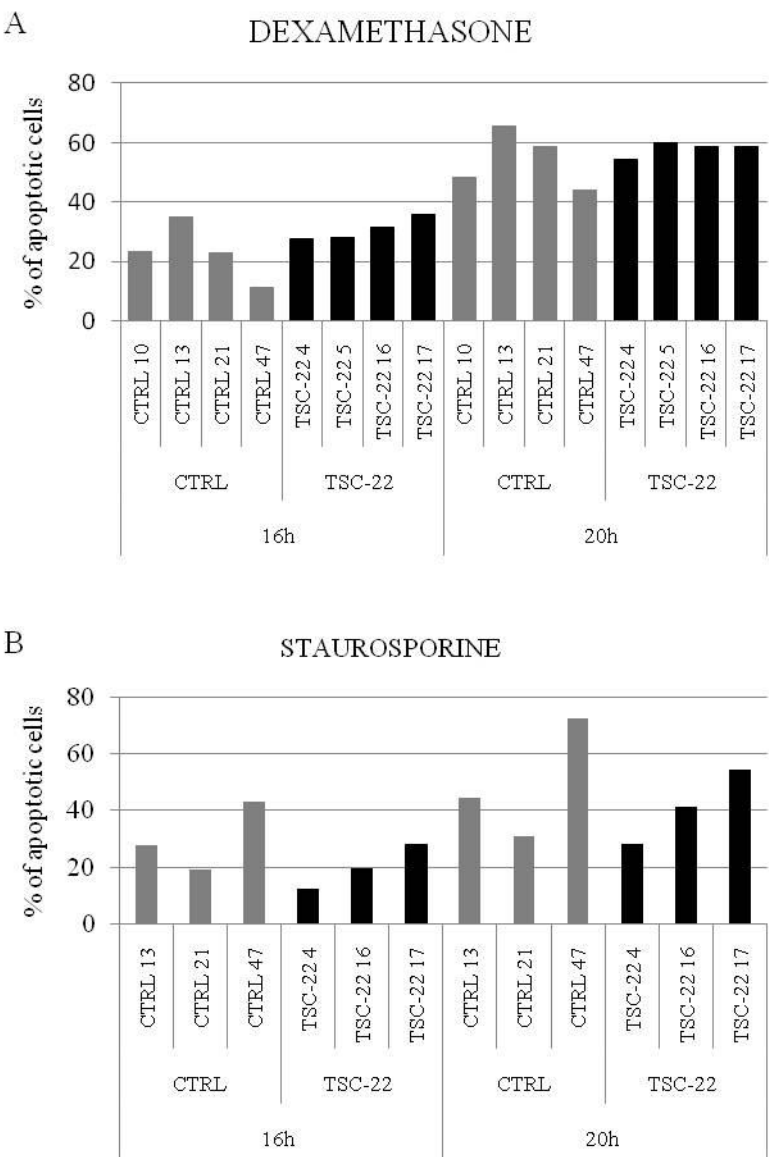


Figure 4

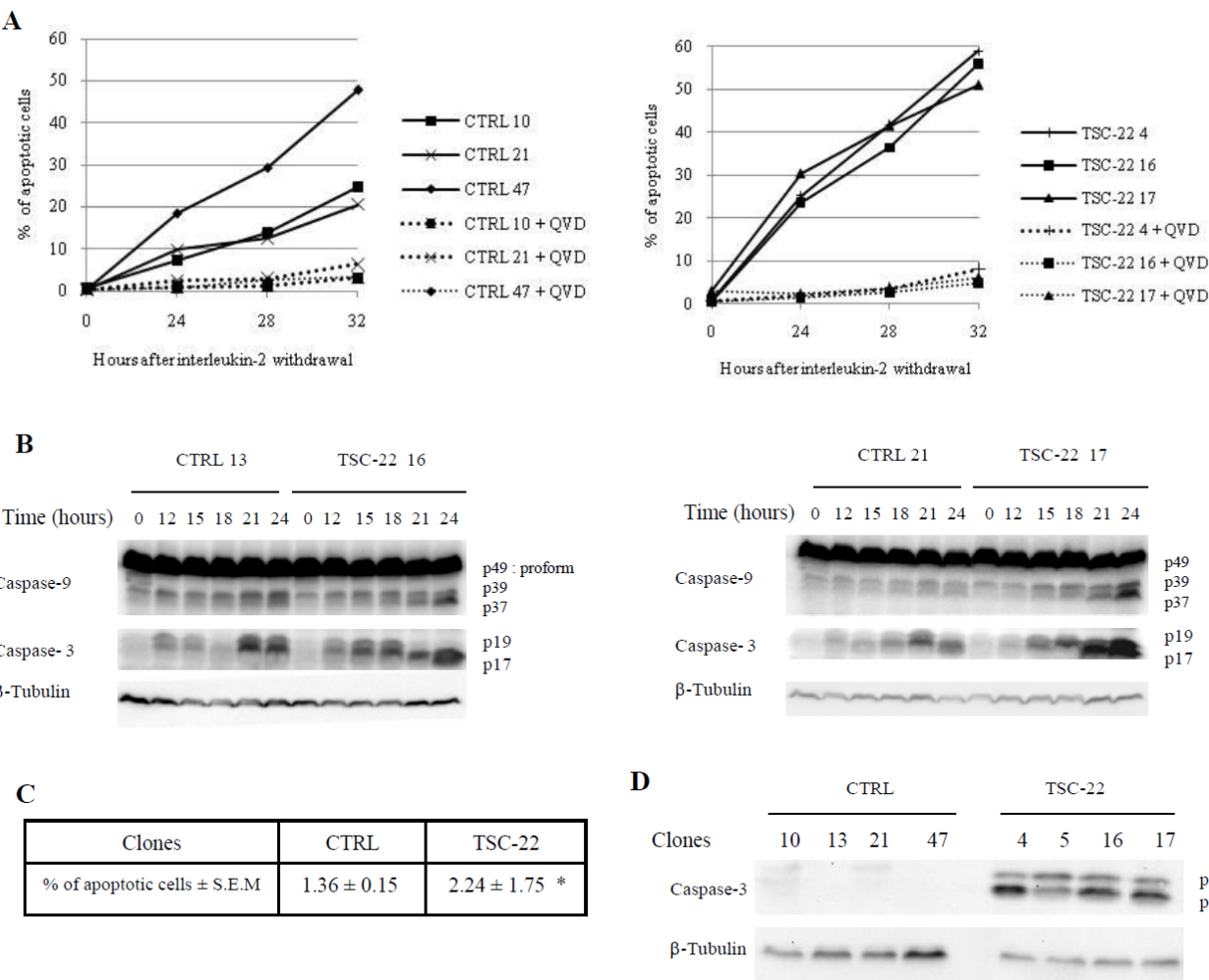
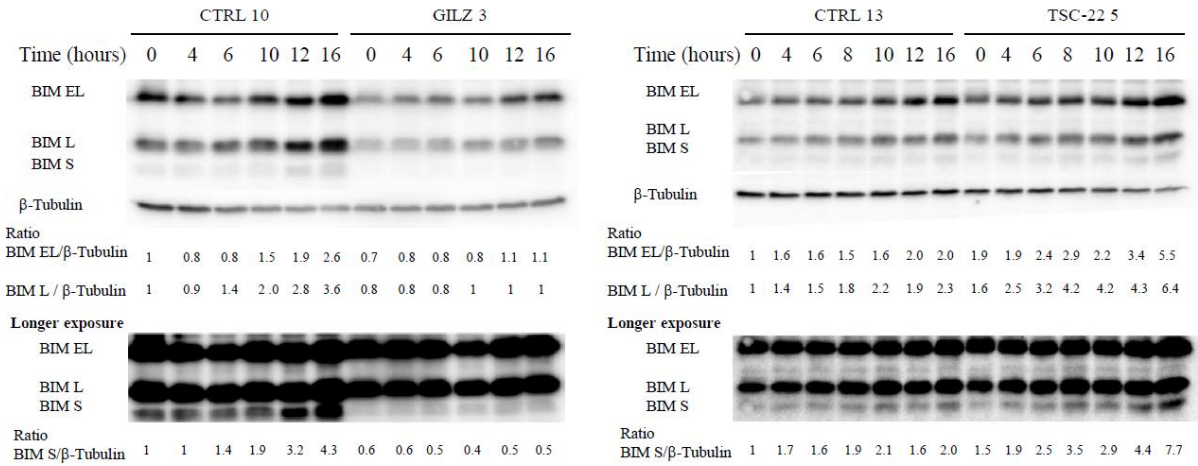
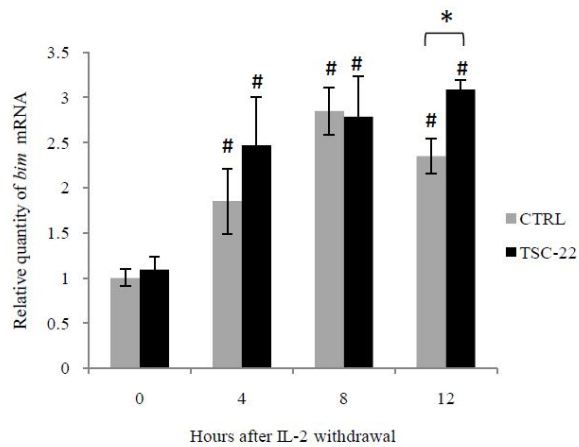


Figure 5
A



B



C

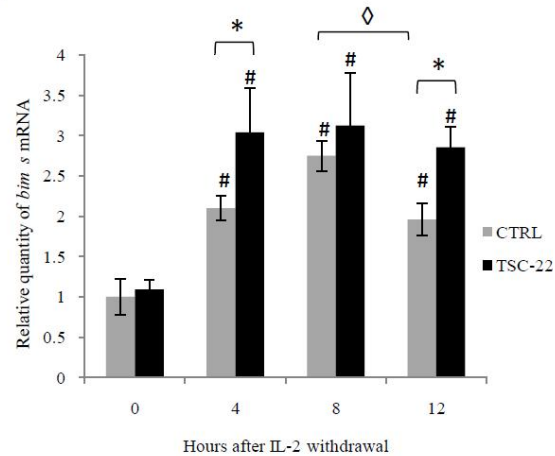


Figure 6

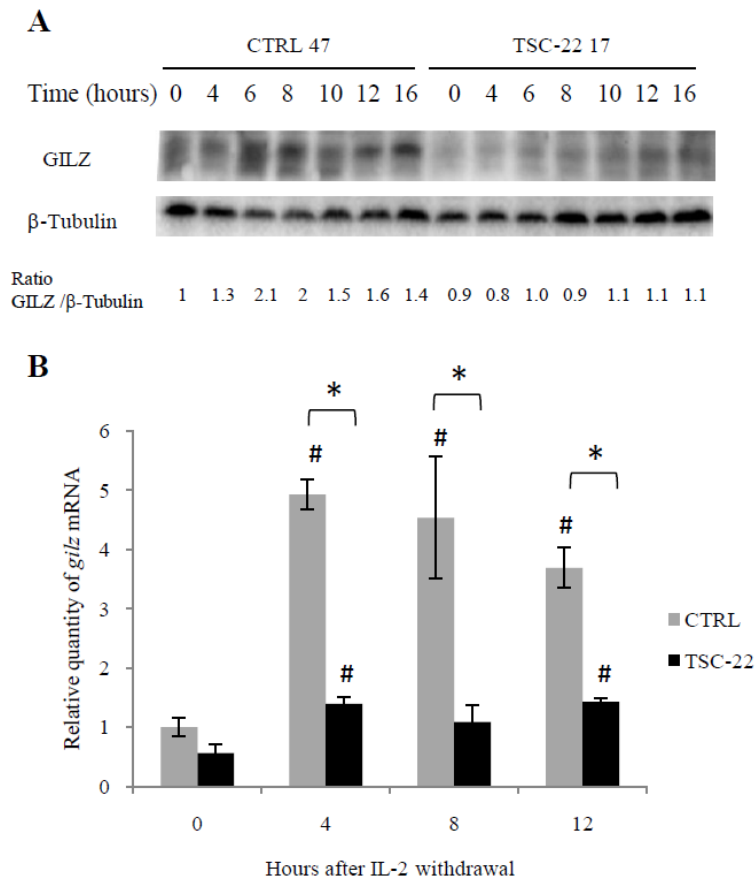
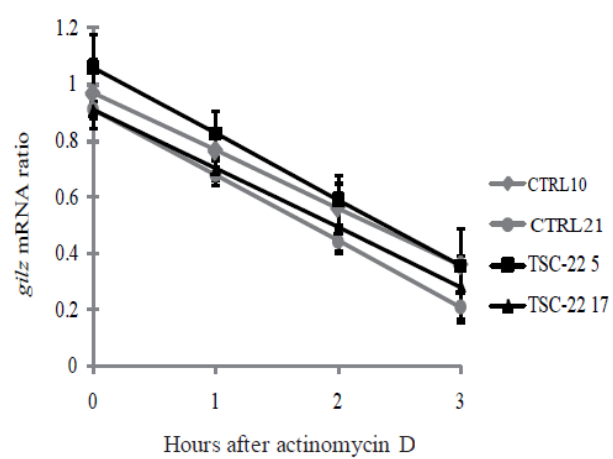


Figure 7

A



B

Clones	<i>gilz</i> mRNA half-life (hours) $\pm$ S.E.M.
CTRL 10	2.5 $\pm$ 0.53
CTRL 21	1.88 $\pm$ 0.19
TSC-22 5	2.73 $\pm$ 0.71
TSC-22 17	2.08 $\pm$ 0.34

RESULTATS

COMPLEMENTAIRES

III. Résultats complémentaires : Etude des mécanismes de l'inhibition de l'expression de GILZ par TSC-22

1. Introduction

Les travaux présentés ci-dessus (article 1) ont permis de montrer que la surexpression de TSC-22 dans les cellules CTLL-2 accélérât la cinétique de l'apoptose induite par la déprivation en IL-2. Nous avons également montré que la présence de TSC-22 inhibait l'induction de l'expression de la protéine et de l'ARNm de *gilz* au cours de la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2.

Précédemment, il a été démontré au sein du laboratoire que la transcription de *gilz* lors de la déprivation en facteurs de croissance des cellules CTLL-2 était régulée par le facteur de transcription FOXO3 (Asselin-Labat *et al.*, 2005). TSC-22 inhibant la transcription de *gilz*, nous avons émis l'hypothèse que cette inhibition transcriptionnelle était due à une régulation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par TSC-22.

Les protéines GILZ et TSC-22 possèdent toutes deux un domaine leucine zipper et une TSC-box. Ces domaines sont impliqués dans l'homodimérisation de GILZ ou de TSC-22 (Kester *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2007), mais aucune interaction directe entre GILZ et TSC-22 n'a été décrite à ce jour. La dimérisation de ces protéines a été démontrée comme étant essentielle à leur activité (Di Marco *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été décrit que l'interaction physique de TSC-22 avec une autre protéine anti-apoptotique, la fortiline, était un mécanisme de régulation de la stabilité de la protéine TSC-22 (Lee *et al.*, 2008). C'est pourquoi il semblait important de déterminer si, dans les cellules CTLL-2, les protéines TSC-22 et GILZ pouvaient interagir.

L'objectif de cette partie du travail était de déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de GILZ par TSC-22, en évaluant d'une part le rôle de FOXO3 dans la régulation de la transcription de *gilz* par TSC-22, ainsi que le rôle de la localisation subcellulaire de TSC-22 et de FOXO3 au cours de la déprivation en IL-2, et d'autre part, la possibilité de l'existence d'une interaction physique entre GILZ et TSC-22.

2. Matériels et méthodes

a. Cellules

La lignée cellulaire promyélocytaire HL-60, dérivée d'un patient atteint de leucémie promyélocytaire aiguë, est cultivée dans du milieu complet. Le milieu complet est composé de RPMI 1640, 0,1 mg/ml de streptomycine, 100 U/ml de pénicilline, 1% de pyruvate de sodium (Fisher Scientific, Illkirch, France), et 10% de sérum de vœu fœtal (Abcys, Paris, France).

La lignée cellulaire CTLL-2, qui est une lignée de lymphocytes T cytotoxiques murins dépendants de l'interleukine-2 (IL-2) pour leur prolifération et leur survie, est également cultivée dans ce milieu complet, auquel de l'IL-2 (2 ng/ml) (Abcys), et du beta-mercaptoéthanol (50µM) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) sont ajoutés.

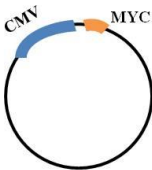
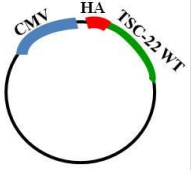
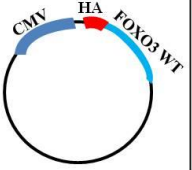
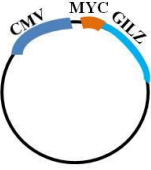
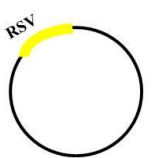
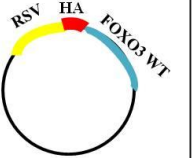
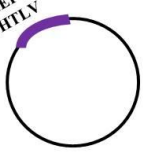
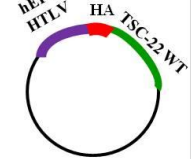
Les cellules sont diluées 24 heures avant l'expérience, afin qu'elles soient à la concentration maximale de 400 000/ml lors de l'expérimentation.

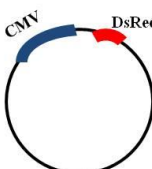
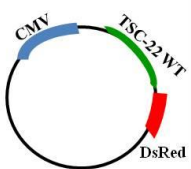
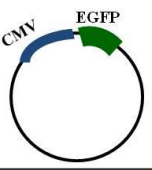
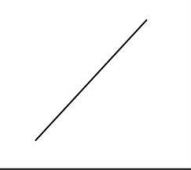
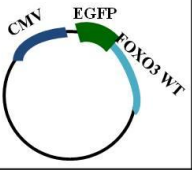
b. Transfections cellulaires

Les cellules HL-60 sont transfectées par électroporation selon les conditions suivantes. Les cellules sont lavées 2 fois dans du milieu RPMI afin d'éliminer le sérum de veau fœtal. 10 millions de cellules sont ensuite ajoutés avec le ou les plasmides d'intérêt dans un volume final de 150 µl dans des cuves d'électroporation 0,4 cm (Eurogentec, Seraing, Belgique). Les cuves sont incubées 10 min dans la glace, soumises à un choc électrique (950 µF, 250 V) à l'aide de l'électroporateur Gene Pulser X cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) et incubées à nouveau 10 min dans la glace. Elles sont ensuite remises en culture dans du milieu complet et incubées à 37°C.

Les cellules CTLL-2 sont également transfectées par électroporation, selon un protocole différent. Les cellules CTLL-2 sont lavées avec du milieu RPMI. 10 millions de cellules, repris dans du milieu RPMI sont ensuite ajoutés dans chaque cuve d'électroporation 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories) avec le ou les plasmides d'intérêt dans un volume total de 200 µl. Les cuves sont aussitôt soumises, à l'aide de l'électroporateur Bio-Rad, à un choc électrique, sous forme de « pulses » successifs (5 « pulses » de 10 ms, de 160 V, espacés de 2 secondes chacun). Les cellules sont ensuite diluées dans du milieu de culture complet, additionné d'IL-2 et de β-mercaptoéthanol.

c. Plasmides utilisés

A	Promoteurs	Vecteurs vides	TSC-22 WT	FOXO3 WT	GILZ WT
	CMV	pcDNA3-Myc 			
	RSV	pRc/RSV 			
	HTLV	pBLAST 			

B	Promoteurs	Vecteurs vides	TSC-22 WT	FOXO3 WT
	CMV	pDsRed 		
		pEGFP 		

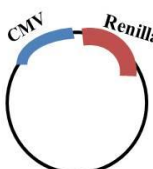
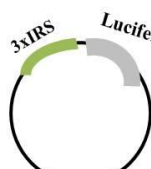
C	Plasmides rapporteurs	pRL-CMV 	Plasmide rapporteur p3xIRS-Luc 

Tableau 2. Schéma des plasmides utilisés. (A) Vecteurs d'expression, (B) Vecteurs d'expression de protéines de fusion fluorescentes (C) Plasmides rapporteurs. Les plasmides sont classés en fonction des promoteurs CMV (Cytomégalo virus), RSV (Rous sarcoma virus), ou HTLV (Human T-Lymphotropic Virus) et en fonction des protéines codées.

Les vecteurs d'expression pcDNA3-Myc, pcDNA3-Myc-GILZ et pcDNA3-FOXO3 WT ont été décrits dans un article publié précédemment (Asselin-Labat *et al.*, 2004). FOXO3 WT a été sous-cloné dans le vecteur pRc/RSV (Invitrogen, Paisley, United-Kingdom). Les

vecteurs pEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) et pEGFP-FOXO3 WT ont été décrits précédemment (Latre de Late *et al.*, 2010).

Le plasmide pcDNA3-TSC-22 nous a été fourni par le Dr Dubois (Gupta *et al.*, 2003). TSC-22 a été sous-cloné dans le vecteur pDsRed-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) d'une part, et d'autre part dans le vecteur pBLAST (Invivogen, San Diego, USA).

Le plasmide rapporteur p3xIRS-MLP-Luc, contenant trois séquences IRS (Insulin Response Sequence), a été décrit précédemment (Latre de Late *et al.*, 2010). Le plasmide pRL-CMV (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France), codant pour la Renilla, utilisé pour normaliser l'activité luciférase par rapport à l'efficacité de transfection, a également été décrit précédemment (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Tous les plasmides sont schématisés dans le tableau ci-dessus (tableau 2).

d. Test d'activité transcriptionnelle

Les cellules HL-60 sont transfectées transitoirement selon le protocole décrit ci-dessus avec 5 µg de plasmide rapporteur, p3xIRS-MLP-Luc, 0,1 µg de pRL-CMV et le ou les différents vecteurs d'expression. Le volume total d'ADN doit être le même dans chaque cuve : le plasmide pcDNA3-Myc, qui est le vecteur contrôle sera donc utilisé pour compléter les quantités d'ADN. Après électroporation, les cellules transfectées sont remises en culture dans trois puits différents : deux puits pour les duplicats de cellules utilisées pour le test d'activité transcriptionnelle et un puits de cellules utilisées pour le Western-Blot. Les cellules ainsi divisées sont cultivées pendant 8 heures, 10 heures ou 24 heures.

Les cellules sont lysées avec le réactif « Passive Lysis Buffer », commercialisé dans le kit Dual Luciferase Reporter Assay décrit précédemment (Latre de Late *et al.*, 2010). Les lysats cellulaires sont ensuite soumis au test luciférase dans les conditions décrites dans une publication antérieure (Latre de Late *et al.*, 2010). Les valeurs brutes sont normalisées en divisant l'activité luciférase par l'activité renilla de chaque échantillon puis en faisant la moyenne des duplicats. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de l'activité du promoteur rapporteur en considérant que 100% équivaut à l'induction observée dans les cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3-FOXO3 ou le plasmide pRc/RSV-FOXO3.

e. Western-Blot

Les cellules HL-60 transfectées sont lysées avec le tampon NP40 décrit auparavant. Les Western-Blot ont été réalisés comme décrit précédemment (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Latre de Late *et al.*, 2010). Les anticorps utilisés sont les anticorps suivants : anti-FOXO3 (07-702, Millipore, Billerica, MA, USA), anti-TSC-22 (Proteintech, Chicago, USA), anti- β -Tubulin (T4026, Sigma Aldrich), et l'anticorps anti-GILZ produit dans les conditions décrites antérieurement (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

f. Co-Immunoprécipitation

Les cellules HL-60 sont transfectées par électroporation avec les différents plasmides et sont remises en culture pendant 8 heures. Elles sont récupérées, lavées avec du PBS, et lysées aussitôt avec le tampon NP40 décrit. Le « pré-clear » est réalisé en incubant sur une roue à 4°C pendant 45 minutes 500 μ g de protéines issues des lysats totaux avec 25 μ l de billes de protéines G (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom), bloquées au préalable avec 5% de BSA (PAA, Pasching, Austria). Un deuxième « pré-clear » est réalisé dans les mêmes conditions. L'anticorps anti-Myc (clone 9E10, produit au sein du laboratoire) est ensuite incubé avec les lysats cellulaires pendant une nuit sur la roue à 4°C. Puis 25 μ l de billes de protéines G sont ajoutés et à nouveau incubés sur la roue pendant 45 minutes. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec le tampon de lyse NP40 complet, puis mélangées avec le tampon de charge des protéines avant d'être portées à ébullition pendant 5 min afin de récupérer les protéines. Ces dernières sont déposées sur un gel d'acrylamide et le western-blot est effectué dans les conditions décrites ci-dessus.

Les anticorps utilisés sont les anticorps anti-GILZ, anti-TSC-22 (Proteintech) et anti-DsRed (Clontech).

g. Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Les cellules en culture sont récupérées aux différents temps, et lysées dans du Trizol® (Invitrogen, Fisher Scientific). L'extraction des ARNm est effectuée selon les recommandations du fabricant. La reverse transcription (RT) est réalisée avec 2 μ g d'ARNm comme décrit précédemment (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Les PCR sont effectuées selon le protocole mis en place au sein du laboratoire (Asselin-Labat *et al.*, 2004) en utilisant des amorces spécifiques des gènes d'intérêt suivants :

- *foxo3* sens : CGG ACA AAC GGC TCA CTC TG
- *foxo3* anti-sens : CCC TCA TTC TGG ACC CGC AT
- *b-actine* sens : GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG
- *b-actine* anti-sens : GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG

Les produits de PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium et sont séparés par électrophorèse. L'intensité des bandes est visualisée et quantifiée grâce au GelDoc® (Bio-Rad Laboratories). Les résultats sont exprimés en rapportant l'intensité de la bande du gène d'intérêt, *foxo3*, à l'intensité de la bande du gène de ménage, *beta-actine*.

h. Immunofluorescence

Les cellules CTLL-2 WT sont transfectées par électroporation avec les plasmides pEGFP, pEGFP-FOXO3 WT, pDsRed ou pDsRed-TSC-22, et/ou pcDNA3-Myc, utilisé comme contrôle afin d'avoir la même quantité d'ADN dans chaque cuve. Les quantités de plasmide codant pour FOXO3 ou pour TSC-22 sont différentes, c'est-à-dire 7,5 µg de plasmide pEGFP ou pEGFP-FOXO3, et 12,5 µg de plasmide pDsRed ou pDsRed-TSC-22, afin d'obtenir la même intensité de fluorescence dans les cellules pour chaque protéine. Les cellules sont remises en culture en présence d'IL-2 pendant la nuit.

Le lendemain matin, une partie des cellules est récupérée pour constituer le temps 0. Les autres cellules sont déprivées en IL-2 et remises en culture sans IL-2 pendant 8 heures. Les cellules sont ensuite récupérées, lavées avec du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) puis fixées pendant 15 minutes dans un tampon contenant 2% de paraformaldéhyde et 1,5% de sucrose. Deux lavages avec du PBS sont ensuite effectués. Puis les cellules sont incubées avec 50 mM de NH₄Cl pendant 10 minutes, avant d'être lavées deux fois en PBS. Elles sont ensuite reprises dans du milieu de montage Dako® (Glostrup, Danemark), contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride ou bisbenzimidazole H 33258 (Sigma)) pour marquer le noyau en bleu avant d'être déposées entre lame (SuperFrost Ultra Plus®, Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne) et lamelle.

Les cellules fluorescentes sont ensuite observées à l'aide d'un microscope Zeiss Imager Z1, camera Axio Cam R3.

3. Résultats

a. Régulation de la transcription de *gilz* par TSC-22 via une modification de l'activité transcriptionnelle de FOXO3

La transcription de *gilz* est induite par le facteur de transcription FOXO3, activé lors de la déprivation en IL-2 des CTLL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'inhibition de la transcription de *gilz* en présence de TSC-22 pourrait être due à une diminution de l'activité de FOXO3 par TSC-22.

Nous avons réalisé des tests d'activité transcriptionnelle en utilisant le plasmide rapporteur synthétique p3xIRS-Luc, composé uniquement d'éléments de réponse aux facteurs de la famille Forkhead. La lignée cellulaire choisie pour ces expériences est la lignée cellulaire HL-60 en raison de plusieurs de ses caractéristiques : la survie de cette lignée cellulaire est indépendante de l'IL-2 ; la protéine TSC-22 est exprimée, tandis que la protéine FOXO3 n'est pas détectable par Western-Blot.

i. Co-transfection pcDNA3-FOXO3 et pcDNA3-TSC-22

Les cellules HL-60 ont donc été co-transfectées transitoirement avec les différents vecteurs d'expression (pcDNA3, pcDNA3-FOXO3 WT ou pcDNA3-TSC-22 WT) et les plasmides rapporteurs (p3xIRS-Luc et pRL-CMV) puis remises en culture sur la nuit (environ 16 heures). Le test d'activité transcriptionnelle a ensuite été réalisé (figure 39).

Les résultats permettent de montrer que le plasmide rapporteur étant un plasmide synthétique, il présente l'avantage d'avoir très peu d'activité basale en l'absence de FOXO3. L'activité transcriptionnelle induite par l'expression de FOXO3 est diminuée quand la protéine TSC-22 est exprimée. Cet effet inhibiteur semble être accru quand la quantité de plasmide TSC-22 transfectée est augmentée. Cependant, pour la quantité maximale de 10µg, il semble y avoir un effet plateau (figure 39).

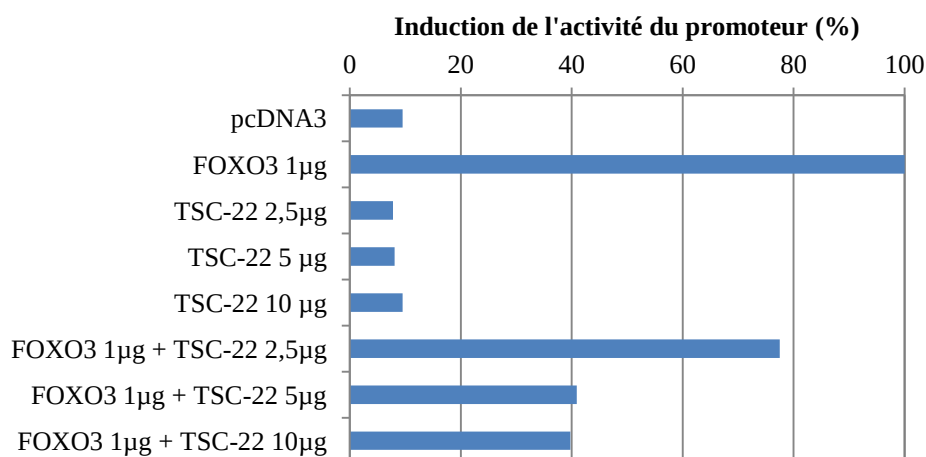


Figure 39. Effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3 WT. Les cellules HL-60 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p3xIRS-Luc (5 µg), pRL-CMV (0,1 µg), et les vecteurs d'expression pcDNA3, pcDNA3-FOXO3 WT (1 µg), et/ou pcDNA3-TSC-22 (2,5 ; 5 ou 10 µg). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de l'activité du promoteur par rapport à l'induction de l'activité du promoteur rapporteur en présence de 1µg de pcDNA3-FOXO3. Il s'agit du résultat d'une expérience représentative de deux expériences indépendantes.

Les vecteurs d'expression co-transfectés lors de ces tests possédant tous un promoteur CMV, il nous a semblé important de vérifier que la diminution de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 n'était pas due à une diminution de son expression, elle-même due à une titration des cofacteurs nécessaires à l'induction de la transcription des promoteurs CMV des différents plasmides.

ii. Détermination des conditions optimales de co-transfection

Afin de réaliser des co-transfections de plasmides codant pour FOXO3 et TSC-22 composés de promoteurs différents, nous avons construit différents plasmides. Les différents vecteurs à notre disposition étaient donc :

- pcDNA3-FOXO3 WT, dont le promoteur provient du CMV (Cytomégalo virus)
- pRc/RSV-FOXO3 WT, dont le promoteur provient du RSV/LTR (Rous Sarcoma Virus / Long Terminal Repeat)
- pcDNA3-TSC-22, dont le promoteur provient du CMV
- pBLAST-TSC-22, dont le promoteur provient du HTLV (Human T-lymphotropic virus).

Nous avons donc testé différentes combinaisons de plasmides afin de déterminer la meilleure association entre les promoteurs.

- Effet des promoteurs seuls CMV, HTLV, et RSV sur les vecteurs pcDNA3-FOXO3 et pRc/RSV-FOXO3

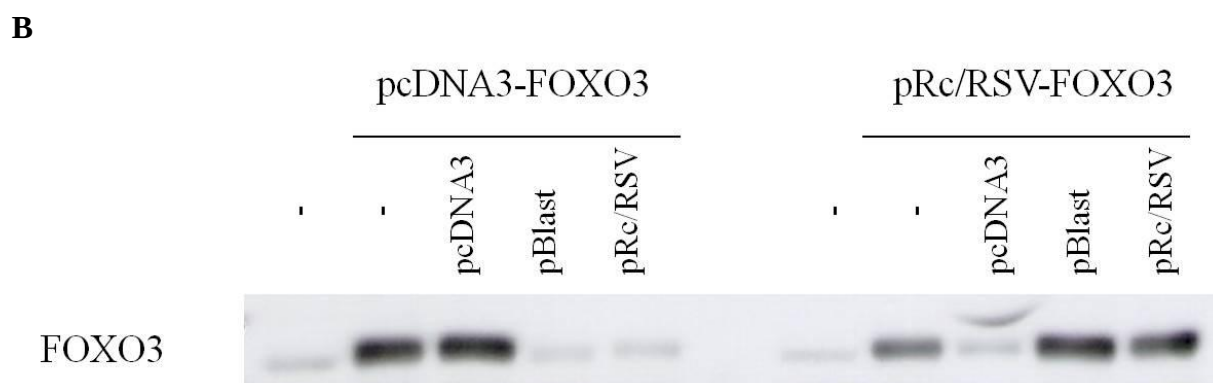
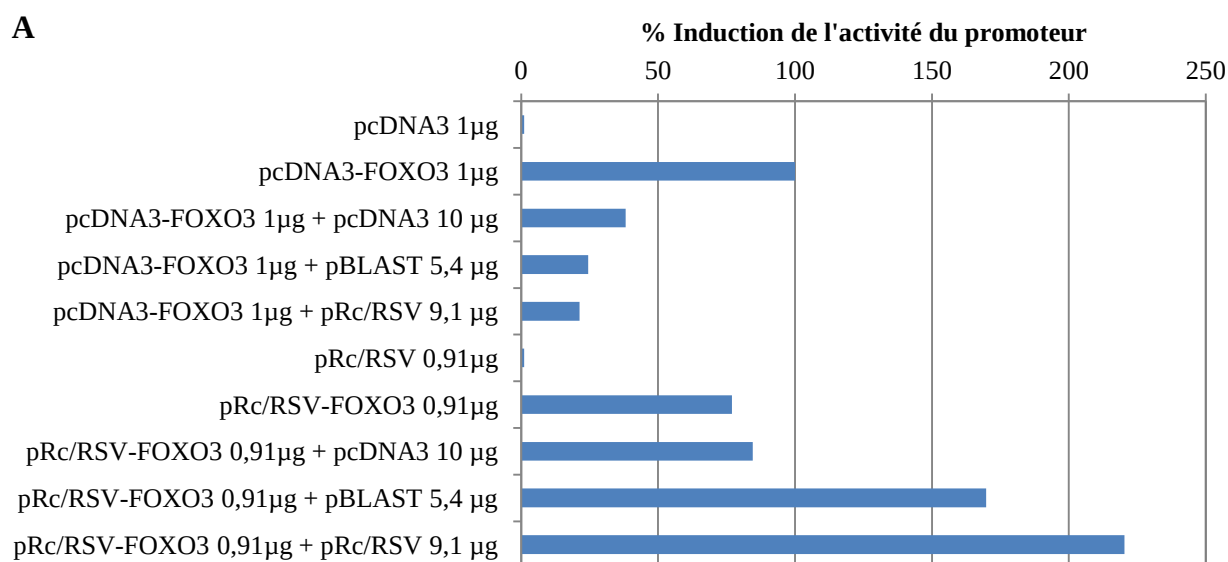


Figure 40. Effet de la co-transfection de pcDNA3, pRc/RSV et pBLAST sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et l'expression protéique de FOXO3. (A) Les cellules HL-60 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p3xIRS-Luc (5 µg), pRL-CMV (0,1 µg), et les vecteurs d'expression pcDNA3, pcDNA3-FOXO3, pBLAST, pRc/RSV, pRc/RSV-FOXO3 en quantités (µg) différentes, afin d'obtenir le même nombre de copies de chaque plasmide. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de l'activité du promoteur rapporteur par rapport à l'activité induite en présence de 1µg de pcDNA3-FOXO3 WT. (B) Les cellules ont été lysées afin d'extraire les protéines, qui sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Le western-blot est réalisé à l'aide de l'anticorps anti-FOXO3.

Les cellules HL-60 ont été transfectées avec soit du pcDNA3-FOXO3, soit du pRc/RSV-FOXO3 et un plasmide vide (pcDNA3, pBLAST ou pRc/RSV). La quantité d'ADN transfectée différait en fonction de la taille des plasmides afin d'obtenir le même nombre de copies des plasmides que pour 1µg de pcDNA3-FOXO3 ou 10µg de pcDNA3. Les cellules ont ensuite été remises en culture pendant huit heures puis récupérées soit pour le test d'activité transcriptionnelle, soit pour le western-blot (figure 40).

Les résultats montrent que la transfection de pcDNA3, de pBLAST, ou de pRc/RSV, diminue nettement l'activité transcriptionnelle de FOXO3 induite par la transfection de 1µg de pcDNA3-FOXO3, suggérant ainsi que l'activité de FOXO3 est modulée par la présence des autres promoteurs (figure 40A). L'analyse du western-blot montre que l'expression de la protéine FOXO3 est en effet diminuée en présence des plasmides pRc/RSV et pBLAST (figure 40B).

D'autre part, l'activité transcriptionnelle induite par la transfection de 0,91µg de pRc/RSV-FOXO3 était plus faible que celle induite par 1µg de pcDNA3-FOXO3 (77% vs 100%). La co-transfection de 10µg de pcDNA3 ne modifiait pas l'activité transcriptionnelle induite par 0,91µg de plasmide pRc/RSV-FOXO3, malgré la diminution de la quantité de protéine FOXO3. Au contraire, la transfection de pBLAST et de pRc/RSV augmentait fortement l'activité transcriptionnelle induite par 0,91µg de plasmide pRc/RSV-FOXO3. Cette induction d'activité était liée à une augmentation de la quantité de protéine FOXO3 (figure 40B).

Enfin, nous avons observé une mortalité des cellules transfectées avec les vecteurs pBLAST ou pBLAST-TSC-22 supérieure à celle des cellules transfectées avec les autres vecteurs, ce qui était un argument supplémentaire en faveur de l'élimination du vecteur pBLAST.

Cette expérience nous a donc permis de conclure que la co-transfection de pRc/RSV-FOXO3 et de pcDNA3-TSC-22 était la co-transfection pour laquelle il y avait peu de variation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3, malgré une diminution de son expression.

- Effet de la quantité de pcDNA3 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3

Suite au choix du meilleur couple de plasmides à co-transfecter, nous devions déterminer les quantités de ces plasmides transfectables pour lesquelles aucun effet inhibiteur du plasmide contrôle n'était observé. Nous souhaitions en outre analyser l'expression de l'ARNm et de la protéine FOXO3 dans ces différentes conditions, afin de déterminer si le promoteur CMV a un effet sur la transcription ou la traduction de FOXO3.

Les cellules HL-60 ont donc été électroporées avec 0,5 ou 1 µg de pRc/RSV-FOXO3 et différentes quantités de pcDNA3 (1, 5 ou 10 µg) puis remises en culture pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été récupérées et lysées afin d'analyser l'activité transcriptionnelle induite par le plasmide pRc/RSV-FOXO3, ainsi que l'expression de l'ARNm *foxo3* par RT-PCR semi-quantitative, et l'expression de la protéine FOXO3 par Western-Blot (figure 41).

Le résultat du test d'activité transcriptionnelle a permis de montrer que le promoteur CMV (pcDNA3) avait un impact sur l'activité du promoteur rapporteur induite par la construction pRc/RSV-FOXO3 (figure 41A). Ainsi, la transfection de 1µg de pcDNA3 a induit un doublement de l'activité du promoteur, aussi bien pour 0,5 que pour 1µg de pRc/RSV-FOXO3. Cette augmentation d'activité était corrélée, uniquement dans le cas de 0,5µg de pRc/RSV-FOXO3 à une augmentation de la transcription de FOXO3 (figure 41B), mais n'était pas corrélée à une induction de la protéine FOXO3 (figure 41C).

Pour des quantités supérieures de plasmide pcDNA3 (5 et 10µg), aucune induction de l'activité du promoteur rapporteur n'était observée quand 0,5µg de pRc/RSV-FOXO3 était transfecté. Ce résultat n'était pas corrélé à la quantité d'ARNm observée.

Au contraire, dans les cellules transfectées avec 1µg de plasmide pRc/RSV-FOXO3, très peu de variations de l'ARNm de *foxo3* ont été observées en fonction de la quantité de plasmide pcDNA3 transfectée. Dans ces conditions, l'expression de la protéine FOXO3 n'était pas majoritairement modifiée en fonction de la quantité de plasmide pcDNA3 transfectée (figure 41C).

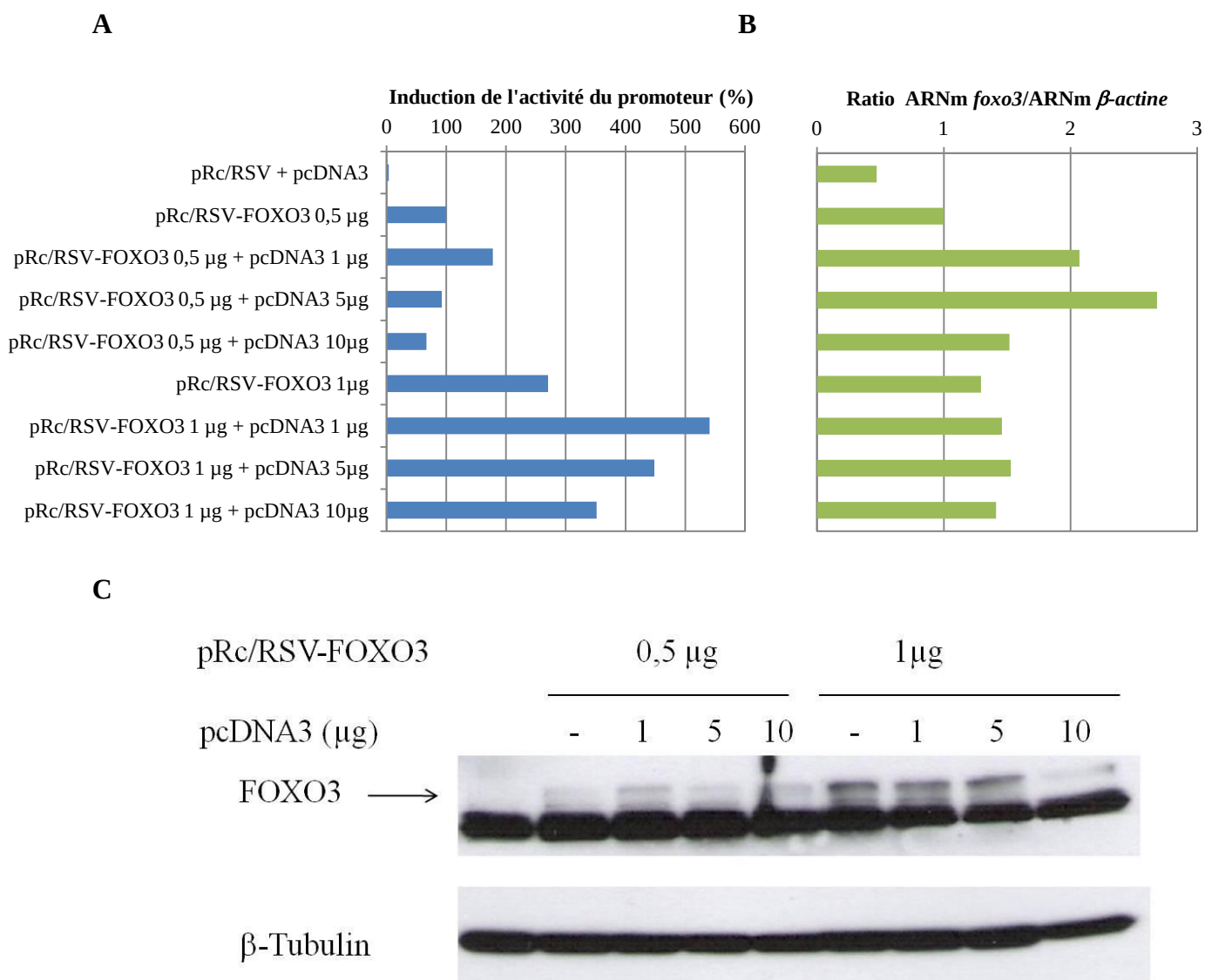


Figure 41. Effet de la co-transfection de pcDNA3 et de pRc/RSV-FOXO3 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3, ainsi que l'expression protéique de FOXO3. (A) Les cellules HL-60 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p3xIRS-Luc (5 µg), pRL-CMV (0,1 µg), et les vecteurs d'expression pcDNA3, pRc/RSV ou pRc/RSV-FOXO3 en quantités (µg) différentes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'induction de l'activité du promoteur rapporteur par rapport à l'induction de l'activité de ce promoteur observée en présence de 0,5 µg de pRc/RSV-FOXO3 WT. **(B)** Les cellules ont été lysées afin d'extraire les ARNm. Sont ensuite effectuées la RT puis des PCR à l'aide d'amorces spécifiques de *foxo3* et de la *beta-actine*, utilisée comme gène de ménage. Les produits de PCR ont été déposés sur un gel d'agarose contenant du BET. L'intensité des bandes spécifiques a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en rapportant la quantité d'ARNm de *foxo3* à la quantité d'ARNm de la *beta-actine*. **(C)** Les cellules ont été lysées afin d'extraire les protéines, qui sont ensuite séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Le western-blot est réalisé à l'aide de l'anticorps anti-FOXO3. La membrane est ensuite déshybridée puis blottée à nouveau avec l'anticorps anti-β-Tubuline.

Ces résultats suggèrent donc que la co-transfection de 1 µg de pRc/RSV-FOXO3 et de pcDNA3 serait la meilleure condition dans les cellules HL-60.

iii. Effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3

L'expérience suivante a consisté à transfecter les cellules HL-60 avec 1 µg de pRc/RSV-FOXO3, et 10 µg de pcDNA3-TSC-22. Nous avons déterminé l'activité transcriptionnelle de FOXO3, ainsi que son expression protéique à différents temps : 4h, 8h et 24h (figure 42).

Afin de comparer la régulation de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par TSC-22 à celle de FOXO3 par GILZ, nous avons également transfecté des cellules avec 10 µg de pcDNA3-GILZ et analysé les résultats dans les mêmes conditions (figure 42).

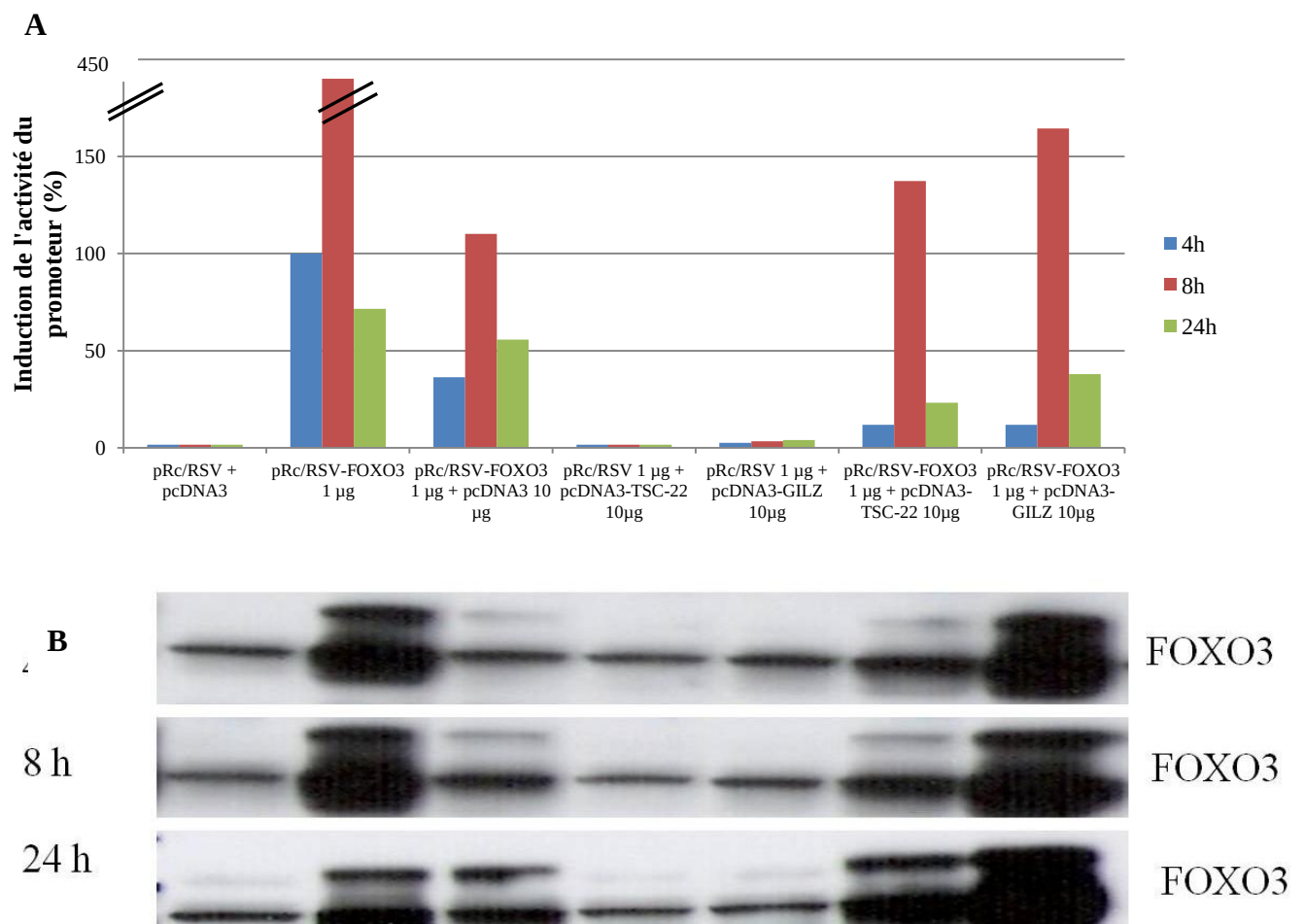


Figure 42. Effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3, ainsi que l'expression protéique de FOXO3. (A) Les cellules HL-60 ont été transfectées avec les plasmides rapporteurs p3xIRS-Luc (5 µg), pRL-CMV (0,1 µg), et les vecteurs d'expression pcDNA3, pRc/RSV, pRc/RSV-FOXO3, pcDNA3-TSC-22 et pcDNA3-GILZ. Les résultats sont exprimés en % d'induction de l'activité du promoteur rapporteur par rapport à l'activité du promoteur induite par les plasmides vides à 4h. (B) Les cellules ont été lysées afin d'extraire les protéines, qui sont ensuite séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Le western-blot est réalisé à l'aide de l'anticorps anti-FOXO3.

Les résultats montrent que la co-transfection de TSC-22 ne diminue pas l'expression de FOXO3 observée en présence de pcDNA3 seul. La co-transfection de GILZ avec FOXO3 ne diminue pas non plus la quantité de protéine FOXO3 exprimée en présence du vecteur contrôle seul. Au contraire, elle a plutôt tendance à augmenter la quantité de FOXO3 présente dans les cellules. Cette observation avait déjà été faite auparavant dans le laboratoire quand les cellules HL-60 étaient transfectées avec les plasmides pcDNA3-FOXO3 et pcDNA3-GILZ (Latre de Late *et al.*, 2010).

D'autre part, le résultat de cette expérience confirme le résultat décrit ci-dessus : la co-transfection du plasmide pcDNA3 diminue l'activité et l'expression de la protéine FOXO3 induite par le plasmide pRc/RSV-FOXO3 (figure 42). Le temps sur lequel nous pouvons nous baser pour déterminer l'effet de TSC-22 sur l'activité de FOXO3 est le temps 24h, car aucune diminution de l'activité transcriptionnelle ni de l'expression de FOXO3 n'est observée quand 10 µg de plasmide pcDNA3 sont ajoutés.

D'autres expériences similaires ont permis de confirmer ce résultat. Ainsi, une expérience réalisée en transfectant 0,5 µg de pRc/RSV-FOXO3 et 2 µg de pcDNA3-TSC-22 dans les cellules HL-60, a permis de montrer que l'activité transcriptionnelle de FOXO3 était diminuée en présence de TSC-22, sans que l'expression de la protéine FOXO3 ne soit modifiée.

iv. Conclusions et perspectives

L'objectif du travail décrit ici était de déterminer si TSC-22 inhibait l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et donc l'induction de l'expression de GILZ.

La réalisation de tests d'activité transcriptionnelle dans les cellules HL-60, surexprimant TSC-22 et FOXO3, en utilisant comme plasmide rapporteur un plasmide possédant les séquences de fixation spécifiques des facteurs FOXO semblait être la méthode la plus évidente. Cependant, nous avons été confrontés à des problèmes d'expression des protéines, probablement dus à la titration de co-facteurs nécessaires à la transcription des gènes codés par les plasmides.

Nous avons donc réalisé une série d'expériences de mises au point afin de déterminer

quels étaient les plasmides co-transfectables et en quelles quantités. La solution qui nous semblait être la meilleure était celle qui consistait à transfecter 1 µg de pRc/RSV-FOXO3 avec 10 µg de pcDNA3-TSC-22.

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence, 24h après transfection, une diminution de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 par TSC-22. Dans ces conditions, TSC-22 ne modifie pas l'expression de FOXO3, mesurée suite à la co-transfection de 1 µg de pRc/RSV-FOXO3 et 10 µg de plasmide contrôle pcDNA3.

Afin de confirmer ce résultat, il serait intéressant de réaliser des tests d'activité transcriptionnelle, en utilisant comme promoteur rapporteur le promoteur de GILZ, cloné au sein du laboratoire (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Plusieurs mutants de ce promoteur avaient été construits : les sites de fixation des facteurs FOXO (FHRE) avaient été mutés. Nous pourrions, en utilisant ces outils, déterminer si TSC-22 régule la transcription de *gilz* en régulant l'activité de FOXO3.

b. Localisation subcellulaire de TSC-22

TSC-22 a été décrit dans plusieurs articles comme un régulateur de la transcription (Ohta *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2010). Il a en outre été démontré que TSC-22 se localisait dans le noyau au cours de l'apoptose (Hino *et al.*, 2000).

Afin de détailler le mécanisme par lequel TSC-22 régule l'expression de GILZ, nous souhaitons déterminer la localisation de TSC-22 dans les LT en présence d'IL-2 et lors de la déprivation en IL-2. Précédemment, il a été montré que GILZ était capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXO3, en le relocalisant dans le cytoplasme (Latre de Late *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous souhaitons également déterminer la localisation de FOXO3 en présence de TSC-22.

Des cellules CTLL-2 WT ont été transfectées par électroporation avec les plasmides pEGFP, pEGFP-FOXO3 WT, pDsRed ou pDsRed-TSC-22. Les cellules ont été remises en culture pendant la nuit. Une partie des cellules a été prélevée et fixée. L'autre partie des cellules CTLL-2 transfectées a été déprivée en IL-2 puis remise en culture sans IL-2 pendant 8 heures. Les cellules ont ensuite été fixées, marquées avec le DAPI et montées entre lame et lamelle.

L'observation des cellules transfectées au microscope a permis de confirmer que la protéine FOXO3, localisée dans le cytoplasme des cellules CTLL-2 cultivées en présence d'IL-2, est retrouvée dans le noyau des cellules CTLL-2 déprivées en IL-2 pendant 8 heures (figure 43). Les résultats montrent également que la protéine TSC-22 est présente uniquement dans le cytoplasme des cellules CTLL-2 en présence d'IL-2 (figure 43). Enfin, la protéine TSC-22 est majoritairement localisée dans le noyau 8h après la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2 (figure 43).

Ces résultats suggèrent donc que TSC-22, cytoplasmique, migre dans le noyau au cours de la déprivation en IL-2, c'est-à-dire au cours de l'induction de l'apoptose. Ces résultats sont donc similaires à ceux publiés précédemment (Hino *et al.*, 2000).

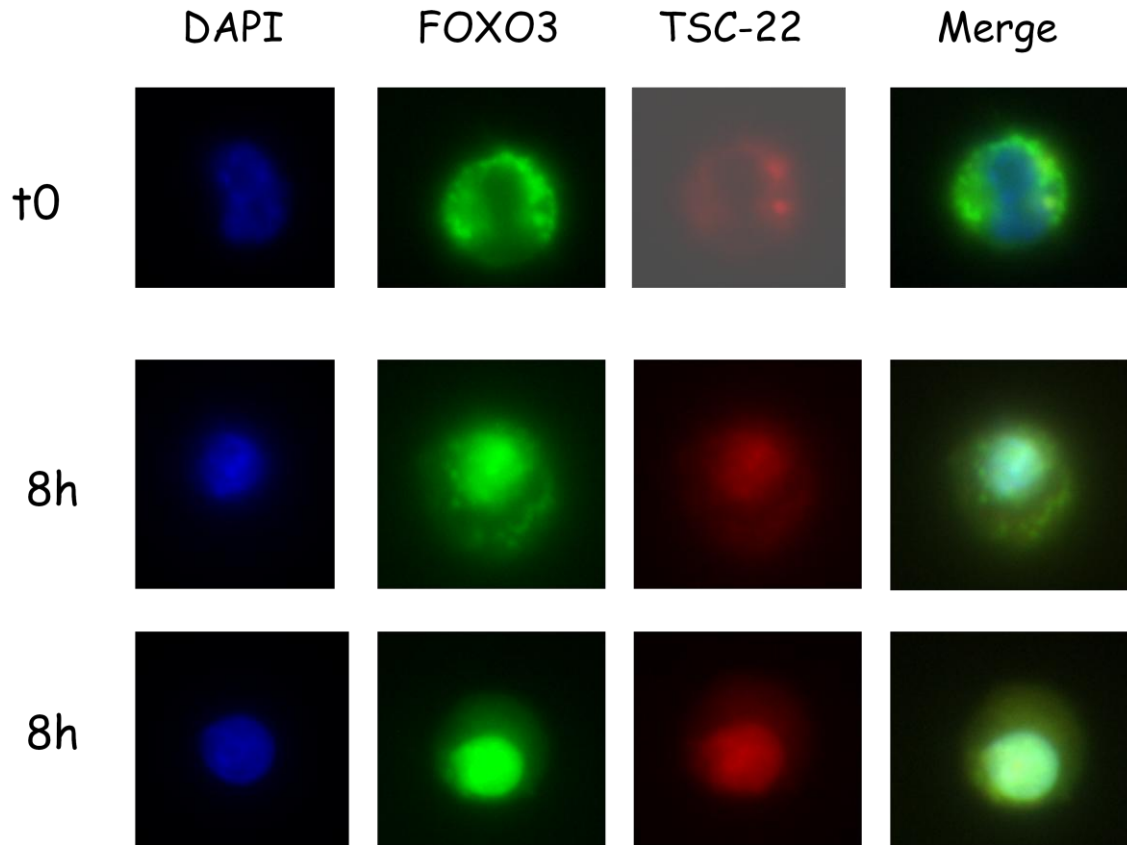


Figure 43. Localisation subcellulaire des protéines FOXO3 et TSC-22 exogènes. Les cellules CTLL-2 WT ont été transfectées transitoirement avec 12,5 µg de plasmide pDsRed-TSC-22 ou pDsRed, et 7,5 µg de plasmide pEGFP-FOXO3WT ou pEGFP et remises en culture pendant la nuit. Une partie des cellules est récupérée et fixée pour constituer le temps t0. Les autres cellules transfectées sont déprivées en IL-2 et remises en culture 8 heures sans IL-2. Elles sont ensuite fixées et incubées avec du DAPI, pour marquer le noyau, présent dans le milieu de montage. Il s'agit d'images représentatives des images enregistrées à partir de 50 cellules différentes exprimant FOXO3 et TSC-22 obtenues suite à trois expériences indépendantes.

D'autres expériences ont permis de montrer que lorsque seule la protéine TSC-22 est exprimée dans les cellules CTLL-2, elle est retrouvée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme au cours de la déprivation en IL-2. Ce qui suggère que la co-expression de FOXO3 et de TSC-22 augmente la relocalisation de TSC-22 dans le noyau.

c. Interaction entre TSC-22 et GILZ

L'interaction entre différentes protéines de la famille TSC-22D a été décrite auparavant. Ainsi, TSC-22 serait capable d'interagir avec THG-1, mais serait également capable de s'homodimériser (Kester *et al.*, 1999). La protéine GILZ, quant à elle, pourrait se dimériser, ce qui lui permettrait d'exercer une inhibition sur l'activité de NF- κ B (Di Marco *et al.*, 2007). La dimérisation entre ces protéines étant indispensable pour qu'elles exercent leur fonction dans certaines conditions, nous avons émis l'hypothèse de l'interaction entre TSC-22 et GILZ.

i. Interaction entre DsRed-TSC-22 et Myc-GILZ

Dans un premier temps, nous avons transfecté les cellules HL-60 avec les vecteurs d'expression pDsRed-TSC-22 et pcDNA3-Myc-GILZ, ou les vecteurs contrôles pDsRed, ou pcDNA3-Myc en quantités identiques, afin de transfecter 20 μ g d'ADN au total. Les cellules sont remises en culture pendant 8 heures. L'immunoprécipitation est réalisée à l'aide de l'anticorps anti-Myc. Les protéines immunoprécipitées sont déposées sur un gel d'acrylamide. 50 μ g de lysats totaux sont également chargés sur le gel, pour vérifier l'expression des protéines (figure 44).

Le résultat du western-blot ci-dessous permet de mettre en évidence l'interaction entre Myc-GILZ et DsRed-TSC-22 dans les cellules HL-60. Le western-blot réalisé à l'aide de l'anticorps anti-DsRed montre que l'anticorps anti-Myc n'interagit pas avec la protéine DsRed, et que l'interaction entre GILZ et TSC-22 n'est pas due aux étiquettes respectives Myc ou DsRed des protéines GILZ et TSC-22.

On peut noter, dans les cellules exprimant DsRed-TSC-22, l'existence de deux bandes pour cette protéine, la bande supérieure étant plus faible que la bande inférieure. Cette bande de taille supérieure est plus importante en présence de GILZ. Lors de l'immunoprécipitation de GILZ avec l'anticorps anti-Myc, les deux bandes de DsRed-TSC-22 sont immunoprécipitées ; la bande de poids supérieur étant plus représentée que la bande de taille inférieure. Nous pourrions supposer que la protéine de taille supérieure est une forme phosphorylée de DsRed-TSC-22, et que cette phosphorylation joue un rôle dans l'interaction entre GILZ et TSC-22.

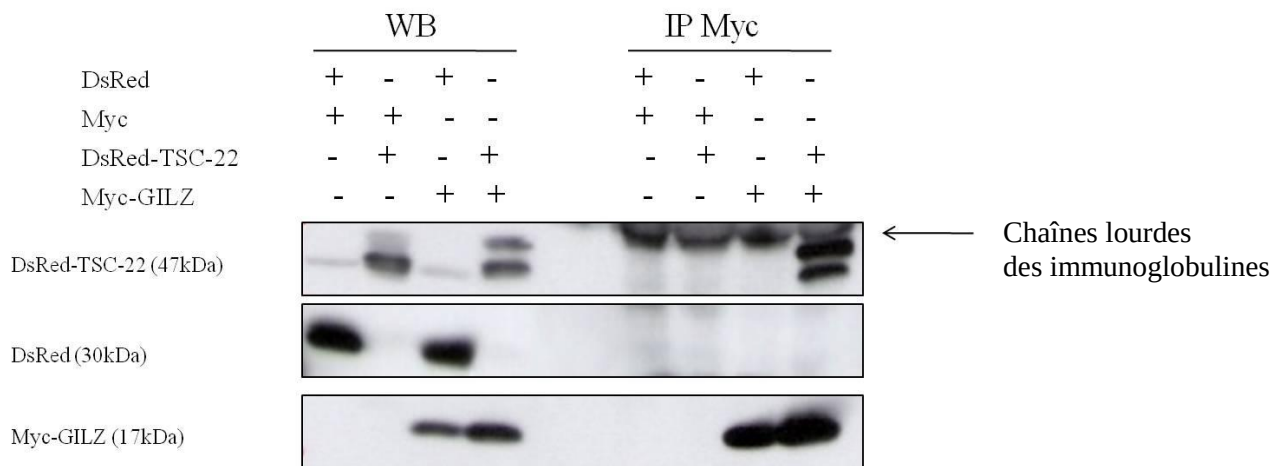


Figure 44. Interaction entre les protéines GILZ et TSC-22 exogènes. Les cellules HL-60 ont été transfectées transitoirement avec 10 µg de plasmide pDsRed-TSC-22 ou pDsRed, et 10 µg de plasmide pcDNA3-Myc-GILZ ou pcDNA3-Myc et remises en culture pendant huit heures. Les cellules sont ensuite récupérées et lysées. L'immunoprécipitation est réalisée à l'aide de l'anticorps anti-Myc. Les lysats totaux (pistes WB) et les protéines immunoprécipitées (pistes IP Myc) sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide. Les western-blot sont réalisés en utilisant les anticorps dans l'ordre suivant : anticorps anti-TSC-22, puis anticorps anti-GILZ, puis anticorps anti-DsRed. Résultat représentatif du résultat obtenu lors de 3 expériences indépendantes.

Ce résultat démontre donc que TSC-22 et GILZ exogènes ont la capacité d'interagir dans les cellules HL-60. Il serait donc intéressant de rechercher si cette interaction peut être possible dans les cellules CTLL-2, d'une part, dans les conditions de culture classiques en présence d'IL-2, et d'autre part, lors de la déprivation en IL-2.

ARTICLE 2 :

Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner.

Perle Latré de Laté, Aurélie Pépin, Hind Assaf-Vandecasteele, Christophe Espinasse, Valérie Nicolas, Marie-Liesse Asselin-Labat, Jacques Bertoglio, Marc Pallardy and Armelle Biola-Vidamment

II. Article 2. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner.

Des travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire ont permis de montrer que l'induction transitoire de GILZ dans la lignée de lymphocytes T murins CTLL-2 déprivée en IL-2 permettait de retarder l'entrée en apoptose. GILZ est en effet capable dans ces conditions d'inhiber l'activité transcriptionnelle du facteur FOXO3, et par conséquent, de diminuer la transcription d'un gène cible de FOXO3, *bim* (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

L'objectif suivant était de caractériser le mécanisme par lequel GILZ inhibait l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Ce travail, auquel j'ai participé, a été réalisé en grande majorité par Perle Latré de Laté.

Dans un premier temps, nous avons choisi de montrer dans une lignée cellulaire indépendante de l'IL-2, l'effet inhibiteur de GILZ sur la transcription de FOXO3. Ainsi, les cellules HL-60 ont été choisies comme modèle cellulaire pour tout ce travail. Il a été démontré grâce à des tests d'activité transcriptionnelle que l'activité des promoteurs de *FasL* et *p27*, régulée par FOXO3, était également inhibée en présence de GILZ.

L'utilisation d'un plasmide rapporteur synthétique, p3xIRS-Luc, a aussi permis de montrer que GILZ était capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription FOXO1 et FOXO4 surexprimés dans les cellules HL-60.

Dans un second temps, afin de déterminer le mécanisme par lequel GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO3, des plasmides codant pour des protéines de fusion GFP-FOXO3 et DsRed-GILZ ont été construits. Ces outils ont permis de montrer que la surexpression de GILZ dans les cellules HL-60 était responsable de la relocalisation de FOXO3 dans le noyau. Cette relocalisation a été décrite comme étant indépendante des kinases Akt/PKB et IKK. Il a en outre été décrit que le domaine NES (Nuclear Export Sequence) de FOXO3 était nécessaire à cette relocalisation et qu'il impliquait le système de transport Crm1.

Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Promotes the Nuclear Exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent Manner^[S]

Received for publication, September 25, 2009, and in revised form, December 3, 2009. Published, JBC Papers in Press, December 14, 2009, DOI 10.1074/jbc.M109.068346

Perle Latré de Laté[‡], Aurélie Pépin[‡], Hind Assaf-Vandecasteele[‡], Christophe Espinasse[‡], Valérie Nicolas[§], Marie-Liesse Asselin-Labat^{‡,1}, Jacques Bertoglio[‡], Marc Pallardy[‡], and Armelle Biola-Vidamment^{‡,2}

From the [‡]Université Paris Sud, INSERM UMR-S 749, Faculté de Pharmacie, and INSERM, Université Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France and the [§]Plate-Forme Imagerie Cellulaire, IFR141-ITFM, Université Paris-Sud 11, 92296 Châtenay-Malabry, France

GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) is an ubiquitous protein whose expression is induced by glucocorticoids in lymphoid cells. We previously showed that GILZ expression is rapidly induced upon interleukin 2 deprivation in T-cells, protecting cells from apoptosis induced by *forkhead box subgroup* O3 (FOXO3). The aim of this work is to elucidate the molecular mechanism of FOXO factor inhibition by GILZ. We show in the myeloid cell line HL-60 and the lymphoid CTLL-2 T-cell line that GILZ down-regulates the expression of p27^{KIP1} and Bim, two FOXO targets involved in cell cycle regulation and apoptosis, respectively. GILZ inhibits FOXO1, FOXO3, and FOXO4 transcriptional activities measured with natural or synthetic FOXO-responsive promoters in HL-60 cells. This inhibitory effect is independent of protein kinase B and I κ B kinase phosphorylation sites. GILZ does not hinder FOXO3 DNA-binding activity and does not physically interact with FOXO3. However, using fluorescence microscopy, we observe that GILZ expression provokes a Crm-1-dependent nuclear exclusion of FOXO3 leading to its relocalization to the cytoplasm. Moreover, GILZ exclusive cytoplasmic localization is a prerequisite for FOXO3 inhibition and relocalization. We propose that GILZ is a general inhibitor of FOXO factors acting through an original mechanism by preventing them from reaching target genes within the nucleus.

Forkhead box subgroup O1 (FOXO1 or FKHR), FOXO3a (FKHRL1), FOXO4 (AFX), and FOXO6 constitute the mammalian FOXO family of transcription factors and achieve important functions in the regulation of genes involved in cell cycle regulation, apoptosis, DNA repair, stress response, energy metabolism, and control of lifespan (for review, see Ref. 1). These highly related members are ubiquitously expressed in all mammalian tissues, interact with the same core consensus DNA sequence, and display overlapping patterns of transcriptional activities (2). Interest about FOXO factors in the hematopoietic system is increasing due to their role in regulation of immune responses. *In vitro*, FOXO3 has been shown to partici-

pate in cytokine withdrawal-induced apoptosis of lymphocytes through up-regulation of Bim (3) or Puma (4). Moreover, the *Fas Ligand* gene has been described as a downstream target of FOXO3 in Jurkat T-lymphocytes (5). *Pink1* was recently described as an anti-apoptotic FOXO3 target gene whose induction upon growth factor deprivation paradoxically prolongs lymphocyte survival (6). *In vivo*, FOXO3 appears to be predominant in peripheral lymphoid organs and to regulate lymphoid and myeloid homeostasis. Indeed, mice bearing a mutated FOXO3 allele presented spontaneous T-cell activation and a multisystemic inflammatory syndrome associated with lymphadenopathy (7). Moreover, adult mice with conditional deletion of FOXO1, FOXO3a, and FOXO4 showed hematopoietic stem cells with increased cell cycling and apoptosis and defective long term repopulating activity in the bone marrow (8). Somatic disruption of the three FOXO genes in mice resulted in thymic lymphomagenesis (9).

Nuclear import of FOXO factors follows stress signals such as oxidative stress or growth factor deprivation, whereas nuclear export results from interaction with the exportin Crm1 (chromosomal region maintenance) and Ran-GTP and from the phosphorylation by the serine/threonine kinase Akt (also called protein kinase B (PKB)),³ generating two binding sites for the 14-3-3 family of proteins. These post-translational modifications also impair DNA binding (5) and promote proteasomal degradation (10). FOXO factors have been recently shown to be regulated by Akt-independent pathways such as phosphorylation, acetylation, or interaction with numerous signaling molecules, suggesting that multiple mechanisms can regulate FOXO transcriptional activity. Indeed, I κ B kinase (IKK β) has been shown to interact with and to phosphorylate FOXO3a at Ser-644, promoting nuclear exclusion and proteasomal degradation independently of PKB phosphorylation (11).

Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) is a ubiquitous 17-kDa protein belonging to the TSC-22 family of proteins characterized by the presence of common domains termed the TSC box and leucine zipper. GILZ has been described as a regulator of gene transcription through protein-protein interactions resulting in inhibition of AP-1 (12) and NF- κ B (13, 14) transcriptional activities, thereby regulating transduction pathways essential to inflammation and immune response. GILZ

^[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2.

¹ Present address: The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victorian Breast Cancer Research Consortium, 1G Royal Parade, Parkville, VIC 3050, Australia.

² To whom correspondence should be addressed: Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. Tel.: 33-1-4683-5980; Fax: 33-1-4683-5496; E-mail: armelle.biola-vidamment@u-psud.fr.

³ The abbreviations used are: PKB, protein kinase B; GILZ, glucocorticoid-induced leucine zipper; IL, interleukin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase; EGFP, enhanced green fluorescent protein; IRS, insulin response sequence; MLP, major late promoter; N/C, nuclear/cytoplasmic ratio; NES, nuclear export signal.

was initially identified as a dexamethasone-responsive gene from a thymus subtraction library (15) and was further shown to be regulated by glucocorticoids in immune cells (15–17) and in human airway epithelial cells (18), appearing as an important mediator of glucocorticoid immunomodulatory and anti-inflammatory actions. GILZ expression is also regulated by IL-4 and IL-10 in monocytes, macrophages, and dendritic cells (17). We previously demonstrated that GILZ expression was rapidly induced upon IL-2 deprivation of T-lymphocytes, protecting these cells from the onset of apoptosis (19). This protection was conferred through inhibition of FOXO3 transcriptional activity, resulting in down-regulation of the pro-apoptotic Bim protein (19). The objective of this work was to determine whether GILZ is a general inhibitor of FOXO transcription factors and to investigate the mechanism of FOXO3 inhibition by GILZ in hematopoietic cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Reagents—The dual luciferase reporter assay system was purchased from Promega (Madison, WI). G418 sulfate was from PAA Laboratories (Pasching, Austria). Leptomycin B was purchased from Sigma.

Cell Culture and Transfection—CTLL-2, an IL-2-dependent murine cytotoxic T-cell line, CTLL-2-Myc clone 1, and CTLL-2-Myc-GILZ clone 6 stably transfected with empty vector or pcDNA3-Myc-GILZ, respectively, were previously described (19). The human HL-60 cell line, established from a patient with acute promyelocytic leukemia, was stably transfected with empty vector or pcDNA3-Myc-GILZ. Selection of stably transfected cells was initiated 48 h after electroporation using 800 μ g/ml of G418 for 2 weeks. Cells were then cloned by limiting dilution. The clones were selected based on GILZ expression (HL-60-Myc-GILZ clones 27 and 32). HL-60-Myc clones 3 and 7 were randomly selected. HL-60 cells and HL-60 clones were cultured in RPMI 1640 medium containing 0.1 mg/ml of streptomycin, 100 units/ml of penicillin, 1% sodium pyruvate, 10% fetal calf serum (Fisher Scientific). Transient transfections were performed using electroporation as previously described (20). The total amounts of transfected DNA were kept constant by addition of empty control vector. Cells were then cultured for 24 h before harvesting.

Plasmid Constructs—Expression vectors pcDNA3-Myc-GILZ, pcDNA3-Myc-FOXO3-WT (wild type) (19), and pcDNA3-Myc-FOXO3-TM (T32A,S253A,S315A) were previously described (19). pcDNA3-Flag-FKHR-WT (FOXO1-WT) and pcDNA3-Flag-FKHR-AAA (FOXO1-TM) were a kind gift from Dr. Tang (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI). pMT2-AFX-WT (FOXO4-WT) was a kind gift from Dr. Burgering (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands). pMT2-FOXO4-TM was obtained by site-directed mutagenesis of pMT2-FOXO4-WT (T28A,S193A,S258A). pcDNA3-Myc-NES-GILZ and pcDNA3-Myc-NLS-GILZ plasmids were obtained by insertion of double-stranded oligonucleotides from the NES sequence of MAPK/ERK kinase (MEK) (5'-GGATGAACCTGGTGGACCTCCAAAAGAA-GCTGGAGGAGCTGGAGCTGGACGAGCAGCAGG-3') or the NLS sequence of the simian virus 40 large-T antigen (5'-GGATCGATCCAAAAAAGAGAAAGGTAGATCCA-

AAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAAGAGAG-AAAGGTAG-3') in SacII/BamHI-digested pcDNA3-Myc-GILZ. pEGFP-FOXO3-WT was a kind gift from Dr. Hung (11) (University of Texas, Houston, TX). pEGFP-FOXO3-TM was generated by site-directed mutagenesis of pEGFP-FOXO3-WT (Thr-32, Ser-253, and Ser-315 were replaced by alanine). The EcoRI-blunt GILZ fragment was subcloned into the pDsRed-N1 vector (Clontech Laboratories) to obtain pDsRed-GILZ. pcDNA3-Myc-FOXO3-TM-NESm (L390A,L391A,L394A) was obtained by site-directed mutagenesis of pcDNA3-Myc-FOXO3-TM. The sequences of the primers were as follows: I394 forward (5'-GGATAACGCCACGCTCCGCCATC-3'), I394 reverse (5'-GGATGGCGGGAGCGTGGCGTTATC-3'), L390 forward (5'-CCTCATGGACGACGCGCTGATGGATAAC-3'), L390 reverse (5'-GTTATCCAGCGCTCGTCCATGAGG-3'), L391 forward (5'-ATG-GACGACGCGGCGGATAACG-3'), and L391 reverse (5'-CGTTATCCGCCGCGTCCAT-5').

Reporter Plasmids—pBim-Luc (3.6 kb) was a kind gift from Dr. Bouillet (WEHI, Melbourne, Australia), p27-Luc was a kind gift from Dr. Coffey (University Medical Center, Utrecht, The Netherlands), and pFasL-Luc was a kind gift from Dr. Green (La Jolla, CA). p3xIRS-MLP-Luc contains three copies of the insulin response sequence (IRS) upstream of the adenovirus major late promoter (MLP) and was a kind gift from Dr. Fukamizu (University of Tsukuba, Japan).

Dual Luciferase Reporter Assay—Reporter assays were performed as previously described (16). Normalized relative luciferase units were calculated as follows: firefly luciferase units/*Renilla* luciferase units. Results were expressed as percentages relative to the FOXO3-normalized relative luciferase units (100%). Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments, each performed in duplicate or triplicate.

Antibodies, Western Blot—Cells were harvested 24 h after transfection and Western blotting was performed as described previously (16) using the following antibodies: polyclonal anti-GILZ (19), monoclonal anti- β -tubulin (T4026, Sigma), polyclonal anti-FOXO3 (07-702, Millipore, Billerica, MA), polyclonal anti-FOXO4 and anti-FOXO1 (9472 and 9462 respectively, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Anti-Bim (sc-11425), anti-14-3-3 (sc1657) and anti-p27^{KIP1} (sc-528) were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Monoclonal anti-Myc 9E10 antibody was produced in the laboratory. Densitometric analysis of the blots was performed using the ImageQuant® software (GE Healthcare, Saclay, France). Nuclear extracts were performed using a Kontes all-glass Dounce homogenizer (kimble/kontes, Vineland, NJ) as described previously (16).

Immunofluorescence—HL-60-Myc and HL-60-Myc-GILZ cells were transfected with 10 μ g of pEGFP-FOXO3-WT or pEGFP-FOXO3-TM and fixed in buffer containing 2% paraformaldehyde and 1.5% sucrose for 15 min. Cells were then quenched with 50 mM NH₄Cl for 10 min. Permeabilization was performed using 0.05% Triton in phosphate-buffered saline medium for 4 min followed by two washes with 1 $\times$ phosphate-buffered saline. Cells were then blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h, stained with the anti-Myc antibody for 90 min at room temperature, and washed 3 times with buffer before

Mechanisms of FOXO Factors Inhibition by GILZ

incubation with a secondary anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa 546 (Molecular Probes) in darkness for 90 min at room temperature. Cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (bibi-zimide H 33258, Sigma) for nucleus labeling. Dako mounting medium was used (Glostrup, Denmark). The immunolabeled cells were examined with a Zeiss Imager Z1, camera Axio Cam R3. The fluorescence intensity of the nuclear and cytoplasmic compartments was quantified using ImageJ software, and at least 200 cells were counted to calculate the nuclear/cytoplasmic ratio (N/C) of either EGFP-FOXO3-WT or EGFP-FOXO3-TM. The fluorescence of the EGFP-FOXO3 protein was higher in the nucleus than in the cytoplasm ($N/C > 1$) and the fluorescence was higher in the cytoplasm than in the nucleus ($N/C < 1$), but fluorescence was similar in the two compartments ($N/C = 1$). Results were expressed as percentages.

DNA Affinity Precipitation of FOXO3 Proteins—HL-60 cells transfected with 5 μ g of pcDNA3-FOXO3-TM and with or without 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ were harvested 24 h after transfection. Double-stranded 5'-biotinylated IRS oligonucleotides of the IGF1R promoter were coupled to streptavidin-agarose beads (Sigma) and nuclear and cytoplasmic extracts were incubated with the precoated beads. Beads were then washed and boiled in a reducing sample buffer containing 40% glycerol, 125 mM Tris (pH 6.8), 4% SDS, 5% β -mercaptoethanol, and 0.025% bromophenol blue to elute bound proteins. Western blots were performed using the anti-FOXO3 antibody.

Co-immunoprecipitation Assay—Cells were transfected with 2.5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ and/or 5 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT plasmids and then cultured overnight before harvesting. Cells were lysed in a lysis buffer containing 50 mM Hepes (pH 7.3), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1.5 mM magnesium chloride, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 200 μ M sodium orthovanadate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml of aprotinin, and 1 μ g/ml of leupeptin. A total of 600 μ g of total protein extract was precleared by incubation with 30 μ l of Protein G-Sepharose 4 fast flow beads (GE Healthcare) at 4 $^{\circ}$ C for 45 min with preimmune serum. Precleared samples were then incubated for 3 h with 30 μ l of protein G-Sepharose beads and 5 μ g of anti-FOXO3 or anti-GILZ antibodies at 4 $^{\circ}$ C. The beads were washed 5 times with lysis buffer containing 0.1% Triton X-100 supplemented with proteases and phosphatases inhibitors and boiled in reducing sample buffer before performing Western blotting.

Statistical Analysis—Experiments were performed at least three times and presented as mean $\pm$ S.E.M. p values were determined using the Student's test. Results were considered significant for $p < 0.05$. For microscopy statistical analysis, data were analyzed with one-way analysis for variance and regression analysis for correlations using GraphPad InStat 3 (San Diego, CA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

GILZ Overexpression Down-regulates $p27^{KIP1}$ and Bim Protein Expression in IL-2-deprived CTLL-2 Cells and HL-60 Cells—Withdrawal of IL-2 in CTLL-2 cells results in up-regulation of Bim expression. We

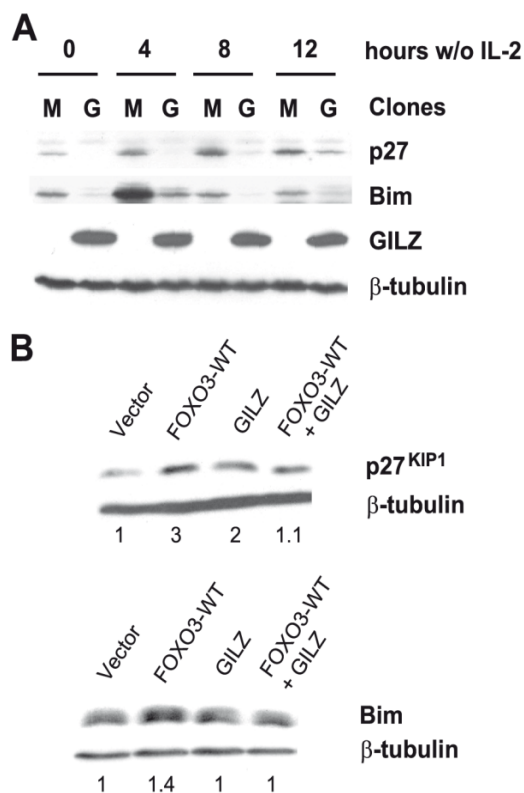


FIGURE 1. GILZ expression down-regulates $p27^{KIP1}$ and Bim protein in IL-2-deprived CTLL-2 cells and in HL-60 cells. A, CTLL-2-Myc 1 or CTLL-2-Myc-GILZ 6 clones were deprived of IL-2 and lysed for the indicated periods of time. Western blot was performed using anti- $p27^{KIP1}$ and anti-Bim antibodies. After stripping, membranes were reblotted with an anti- β -tubulin antibody as a loading control. A representative experiment of three is shown. M, CTLL-2-Myc 1; G, CTLL-2-Myc-GILZ 6. B, HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT, pcDNA3-Myc-GILZ, or pcDNA3-Myc (empty vector) and lysed after 24 h of incubation. Western blot was performed using anti- $p27^{KIP1}$ and anti-Bim antibodies. After stripping, membranes were reblotted with an anti- β -tubulin antibody as a loading control. A representative experiment of three is shown.

previously described that in GILZ-overexpressing CTLL-2 cells, Bim expression was delayed (19), protecting these cells from IL-2 deprivation-induced apoptosis. This effect was mediated through inhibition of FOXO3 transcriptional activity, explaining the inhibition of Bim expression. $p27^{KIP1}$ is a cyclin-dependent kinase inhibitor known to be regulated by FOXO3 upon growth factor deprivation and involved in cell cycle regulation (21). To determine whether GILZ could affect the levels of $p27^{KIP1}$ in CTLL-2 cells, control or GILZ-overexpressing clones were deprived of IL-2 for 4, 8, and 12 h. $p27^{KIP1}$ expression was induced in a time-dependent manner between 4 and 12 h after IL-2 deprivation in the control clone (Fig. 1A). In GILZ-overexpressing cells, $p27^{KIP1}$ expression was down-regulated compared with control clones. These results were observed in all clones tested. Comparable results were obtained for Bim as previously described (Fig. 1A) (19).

To evaluate whether these results were specifically related to FOXO3 inhibition, we used the HL-60 cell line, a hematopoietic cell line independent of cytokines for proliferation and survival. FOXO proteins were undetectable in this cell line under normal growing conditions (first lanes of Figs. 2E, 3E, and 4B). HL-60 cells were cotransfected with the expression vectors for FOXO3-WT and/or GILZ (Fig. 1B). FOXO3 and GILZ expres-

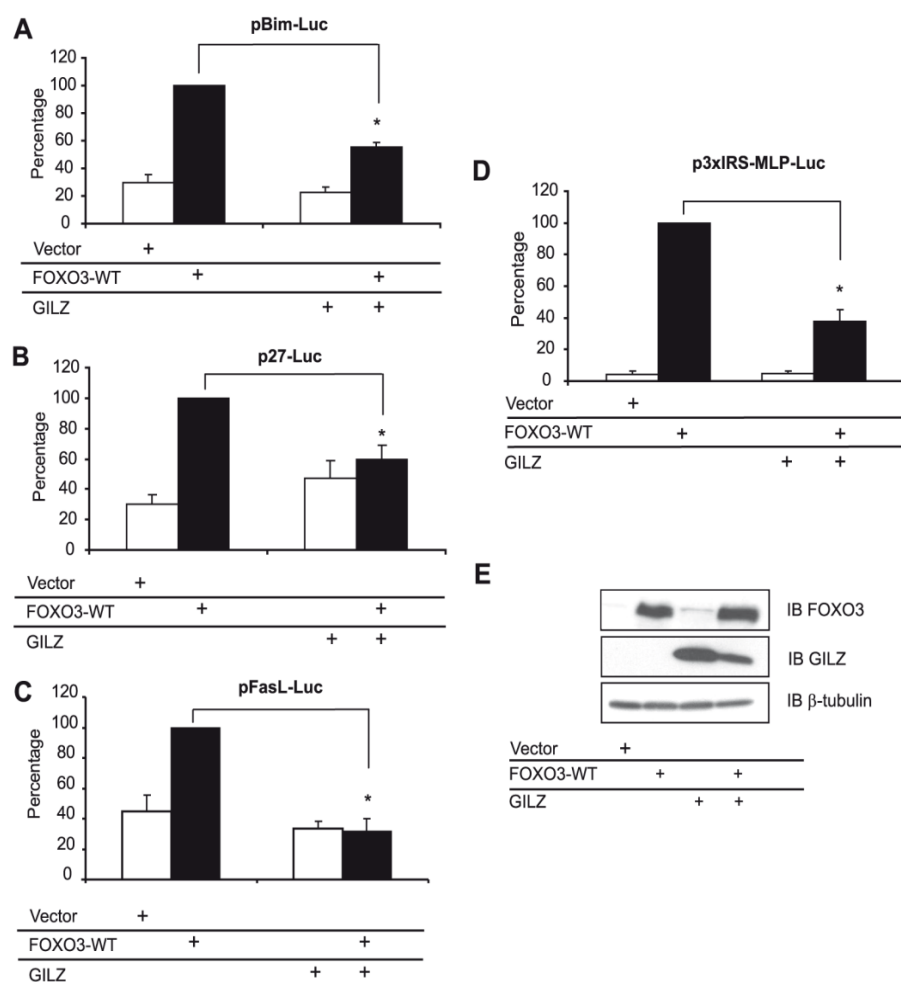


FIGURE 2. GILZ inhibits FOXO3-WT transcriptional activity in HL-60 cells. HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT and/or 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc and with 10 μ g of the reporter plasmid pBim-Luc (A), 10 μ g of p27-Luc (B), or pFasL-Luc (C). The transcriptional activity was analyzed after 24 h of culture. Results are expressed as the percentage of the reporter activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO3-WT. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$. D, HL-60 cells were transiently transfected with 5 μ g of the reporter plasmid p3xIRS-MLP-Luc and with either 1 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT and/or 5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc. Results are expressed as a percentage of p3xIRS-MLP-Luc activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO3-WT. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. E, HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT and/or 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc and cells were harvested after 24 h of culture. Western blot (IB) was performed using anti-FOXO3 and anti-GILZ antibodies. β -Tubulin was used as an internal control for protein levels. Error bars, S.E.

sions are shown on Fig. 2E. Western blot analysis showed that GILZ inhibited FOXO3-induced Bim and $p27^{KIP1}$ expression in HL-60 cells. These observations suggested that the inhibitory effect of GILZ was not restricted to endogenous FOXO factors activated by IL-2 deprivation in the CTLL-2 cell line but could also be observed using exogenous FOXO3 in another hematopoietic cell line. The HL-60 model will then be used to study the mechanisms of FOXO inhibition by GILZ.

GILZ Inhibits FOXO3, FOXO4, and FOXO1 Transcriptional Activities in HL-60 Cells—HL-60 cells were cotransfected with expression vectors for FOXO3-WT and/or GILZ, along with reporter plasmids measuring *BIM*, $p27^{KIP1}$, and *FASL* promoter activities. Results showed that GILZ significantly inhibited *BIM* promoter transactivation in FOXO3-WT-expressing HL-60 cells (Fig. 2A), confirming results previously described in the CTLL-2 cell line. GILZ also inhibited FOXO3-induced $p27^{KIP1}$

(Fig. 2B) and *FASL* (Fig. 2C) promoter activities. Besides acting directly on FOXO3, GILZ could alter recruitment of coactivators on these natural composite promoters. To address this hypothesis and specifically evaluate the effect of GILZ on FOXO3 transcriptional activity, we performed experiments using the p3xIRS-MLP-Luc reporter construct composed of only 3 canonical IRS elements. Results showed that this promoter displayed a very low basal activity and that GILZ strongly inhibited FOXO3-WT-induced transactivation of this synthetic promoter (Fig. 2D). Western blotting experiments revealed that coexpression of GILZ and FOXO3 did not result in a decreased amount of FOXO3 protein (Fig. 2E) suggesting that the inhibitory effect of GILZ was not due to FOXO3 degradation. Surprisingly, GILZ expression was slightly decreased when coexpressed with FOXO3. However, mRNA expression of *GILZ* measured by semi-quantitative reverse transcriptase-PCR was not modified, showing that this effect was not due to transcriptional interference between the two expression vectors (data not shown).

FOXO factors are known to interact with the same core consensus DNA sequence to modulate common target gene expression (2). Nevertheless, functional as well as structural differences exist between these family members. We then asked whether the inhibitory effect of GILZ was conserved among the

FOXO family of transcription factors. HL-60 cells were cotransfected with expression vectors for FOXO4 and/or GILZ, along with reporter plasmids (pBim-Luc, p27-Luc, pFasL-Luc, and p3xIRS-MLP-Luc). As shown in Fig. 3, GILZ significantly reduced *BIM* (Fig. 3A), $p27^{KIP1}$ (Fig. 3B), *FASL* (Fig. 3C), and p3xIRS (Fig. 3D) promoter transactivation in FOXO4-WT-expressing HL-60 cells without affecting FOXO4 protein levels (Fig. 3E). We were not able to measure the transactivation of FOXO1-induced *BIM* and *FASL* in HL-60 cells, despite obvious expression of the FOXO1 protein in this cell line upon transfection (Fig. 4B), suggesting that FOXO1 alone cannot transactivate these natural promoters in HL-60 cells. However, FOXO1 expression significantly increased p3xIRS-MLP-Luc activity (Fig. 4A) and GILZ expression strongly inhibited FOXO1-WT transcriptional activity (Fig. 4A) without affecting FOXO1 protein levels (Fig. 4B). Altogether, these results sug-

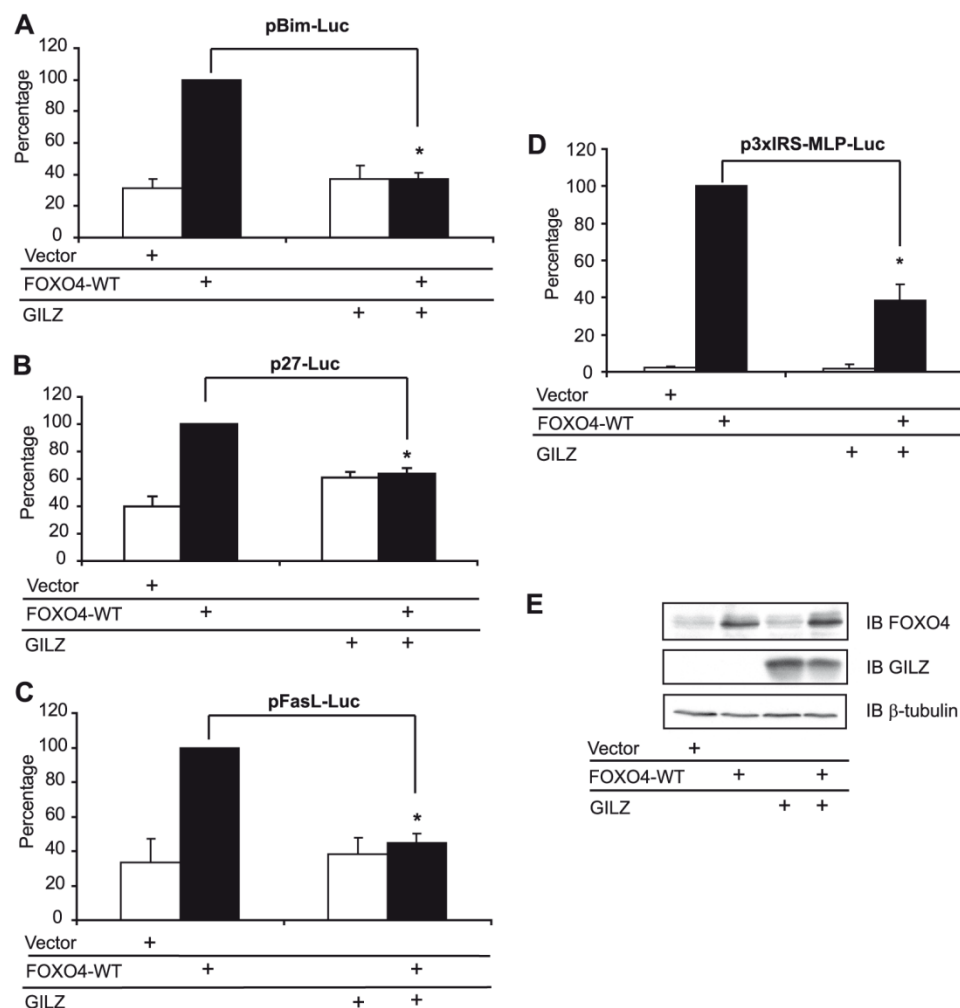


FIGURE 3. GILZ inhibits FOXO4-WT transcriptional activity in HL-60 cells. HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pMT2-FOXO4-WT and/or 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc and with either 10 μ g of the reporter plasmid pBim-Luc (A) or 10 μ g of p27-Luc (B) or pFasL-Luc (C). The transcriptional activity was analyzed after 24 h of culture. Results are expressed as the percentage of reporter activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO4-WT. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of 3 independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$. D, HL-60 cells were transiently transfected with the reporter plasmid p3xIRS-MLP-Luc and either 1 μ g of pMT2-FOXO4-WT and/or 5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc. Results are expressed as the percentage of p3xIRS-MLP-Luc activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO4-WT. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$. E, HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pcDNA3-FOXO4-WT and/or 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc, and cells were harvested after 24 h of culture. Western blot was performed using anti-FOXO4 and anti-GILZ antibodies. β -Tubulin was used as an internal control for protein levels. IB, immunoblot. Error bars, S.E.

gest a common mechanism for inhibition of FOXO transcription factors by GILZ.

GILZ Inhibition of FOXO-mediated Transcription Is Not Dependent on PKB and IKK Phosphorylation Sites—FOXO proteins are regulated by growth factor signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase-PKB pathway. PKB phosphorylation of the two N-terminal residues (T1 and S1, Fig. 5A) generates binding sites for 14-3-3 proteins, resulting in nuclear exclusion of the FOXO-14-3-3 complex. This raised the possibility that the inhibitory effect of GILZ might be related to PKB-mediated phosphorylation of FOXO, resulting in inactivation of FOXO activity by translocation from the nucleus to the cytoplasm. To test this hypothesis, we used FOXO-TM mutants in which the three PKB phosphorylation sites were mutated to alanine (Fig. 5A). Due to these substitutions, these constitu-

tively activated mutants are known to be predominantly located in the nucleus (22). HL-60 cells were cotransfected with pcDNA3-FOXO3-TM, pMT2-FOXO4-TM, or pcDNA3-FOXO1-TM and/or pcDNA3-Myc-GILZ, along with the p3xIRS-MLP-Luc plasmid, and transcriptional activity was analyzed after a 24-h culture. Results showed that GILZ significantly inhibits FOXO3-TM- (Fig. 5B), FOXO4-TM- (Fig. 5C), and FOXO1-TM- (Fig. 5D) induced transactivation of p3xIRS-MLP-Luc, suggesting that PKB phosphorylation sites were not involved in FOXO inhibition by GILZ. IKK β has also been shown to interact with and phosphorylate FOXO3a *in vivo* and *in vitro* at Ser-644, promoting nuclear exclusion and proteasomal degradation independently of PKB phosphorylation (11). We performed site-directed mutagenesis experiments to generate FOXO3-WT-S644A and FOXO3-TM-S644A plasmids. We observed that these mutants displayed a lower transcriptional activity than FOXO3-WT and FOXO3-TM, respectively. However, they were still significantly inhibited by GILZ (Fig. 5, E and F) suggesting that Ser-644 phosphorylation did not play a role in the mechanism of FOXO3 inhibition by GILZ.

FOXO3 Is Mainly Cytoplasmic in the Presence of GILZ—We then tested the hypothesis that GILZ could reduce the amount of FOXO3 in the nucleus. HL-60 cells were transiently transfected with

pcDNA3-Myc-GILZ and/or pcDNA3-FOXO3-TM. Western blotting and DNA affinity precipitation experiments were performed with nuclear and cytoplasmic extracts. In the absence of GILZ, FOXO3-TM was predominantly located in the nucleus and bound to the IRS probe as described in the literature (Fig. 6). In the presence of GILZ, FOXO3-TM expression was decreased in the nucleus concomitantly with an increase in the cytoplasm, suggesting a cytoplasmic relocalization of FOXO3-TM (Fig. 6) that has never been described before. DNA binding experiments confirmed the Western blot with a decrease of FOXO3 DNA binding in nuclear extracts in the presence of GILZ, probably related to relocalization of FOXO3-TM in the cytoplasm. Altogether, these results suggested that GILZ did not hinder FOXO3 from binding *in vitro* to the IRS probe. It is also interesting to note that GILZ was

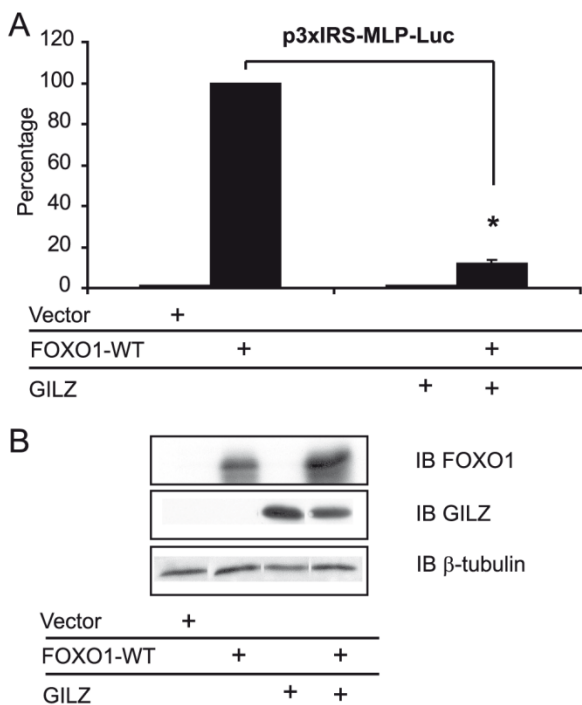


FIGURE 4. GILZ inhibits FOXO1-WT transcriptional activity in HL-60 cells. A, HL-60 cells were transiently transfected with the reporter plasmid p3xIRS-MLP-Luc and either 1 μ g of pcDNA3-FOXO1-WT and/or 5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc, and transcriptional activity was analyzed after 24 h of culture. Results are expressed as the percentage of p3xIRS-MLP-Luc activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO1-WT. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$. B, HL-60 cells were transiently transfected with 10 μ g of pcDNA3-FOXO1-WT and/or 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc and cells were harvested after 24 h of culture. Western blot was performed using anti-FOXO1 and anti-GILZ antibodies. β -Tubulin was used as an internal control of protein levels. IB, immunoblot. Error bars, S.E.M.

localized in the cytoplasm independently of FOXO3-TM expression. The β -tubulin revelation was used to exclude a possible nuclei contamination with cytoplasmic material.

GILZ Expression Regulates FOXO3-WT and FOXO3-TM Nucleocytoplasmic Trafficking—Results presented above suggested an effect of GILZ on FOXO subcellular localization. To address this hypothesis, we performed immunofluorescence experiments in GILZ-expressing HL-60 clones and in randomly selected control clones transiently transfected with pEGFP-FOXO3-WT (Fig. 7, A and B) or pEGFP-FOXO3-TM (Fig. 7, C and D). In all clones tested, GILZ was localized in the cytoplasm (Fig. 7, A and C). As expected, FOXO3-WT was distributed throughout the cell (Fig. 7A) and FOXO3-TM was predominantly localized in the nucleus in HL-60-Myc clones (Fig. 7C). However, in the presence of GILZ, FOXO3-WT was clearly relocalized to the cytoplasm (Fig. 7A). Quantification is shown on Fig. 7B, and statistical differences are found between control and GILZ clones. GILZ also had a profound and statistically significant effect (Fig. 7D) on subcellular distribution of EGFP-FOXO3-TM (Fig. 7C), causing the majority of fluorescence to be retained in the cytoplasm and excluded from the nucleus. These experiments confirmed the results obtained with nuclear and cytoplasmic extracts (Fig. 6) and showed that GILZ-induced FOXO3 cytoplasmic relocalization was independent of PKB phosphorylation.

Cytoplasmic Localization of GILZ Is Required for Efficient Inhibition of FOXO-mediated Transcription—We then wondered whether the cytoplasmic localization of GILZ was necessary for FOXO3 inhibition. We constructed a NES-GILZ mutant (Fig. 8A), where the potent NES of MEK was fused to the GILZ protein, resulting in an exclusive cytoplasmic distribution of the fusion protein as assessed by Western blot on nuclear and cytoplasmic extracts (Fig. 8B). A NLS-GILZ mutant was also constructed, where the NLS of the SV40 T antigen was fused to GILZ, targeting GILZ in the nucleus (Fig. 8B). Results showed that NES-GILZ mainly behaves like wild-type GILZ with the inhibitory effect of this mutant comparable with GILZ-WT (Fig. 8, C and E). However, the NLS-GILZ protein failed to inhibit FOXO3-WT (Fig. 8D) and FOXO3-TM (Fig. 8F) transcriptional activities, suggesting that cytoplasmic localization of GILZ was mandatory for inhibition of FOXO3 transcriptional activity. Interestingly, despite the strong NLS sequence used, a minor fraction of NLS-GILZ was still cytoplasmic, but the level was probably insufficient for FOXO3 inhibition. Levels of FOXO3-WT, FOXO3-TM, GILZ, NLS-GILZ, and NES-GILZ were assessed by Western blot (supplemental Fig. S1). Results showed that NES-GILZ and NLS-GILZ did not affect FOXO3-WT or FOXO3-TM expression. Interestingly, NLS-GILZ, which no longer inhibits FOXO3 transcriptional activity (Fig. 8F), only caused a discrete cytoplasmic relocalization of GFP-FOXO3-TM as assessed by fluorescence microscopy (Fig. 8G) after transient transfection of pcDNA3-NLS-GILZ and pEGFP-FOXO3-TM. The majority of GFP-FOXO3-TM remained in the nucleus in the presence of NLS-GILZ and these results were confirmed by Western blot after nuclear and cytoplasmic fractionation (data not shown).

GILZ Inhibitory Effect Requires a Functional Crm1-dependent Export of FOXO3—A functional Crm1-dependent hydrophobic leucine-rich nuclear export signal is located C-terminal to the DNA-binding domain of FOXO3. We wondered whether the cytoplasmic localization of FOXO3 in the presence of GILZ could be due to inhibition of nuclear import or an acceleration of nuclear export. We performed fluorescence microscopy experiments with HL-60 cells transiently transfected with DsRed-GILZ and GFP-FOXO3-TM. Within 30 min of treatment with 5 ng/ml of leptomycin B, a specific inhibitor of Crm1-dependent nuclear export, GFP-FOXO3-TM rapidly accumulated in the nucleus, in the presence or absence of GILZ (Fig. 9A). These results suggest that FOXO3-TM nuclear import is not impeded by GILZ, that GILZ does not trap FOXO3-TM in the cytoplasm, and that the effect of GILZ on FOXO3-TM cytoplasmic localization requires a functional Crm1-dependent export of FOXO3-TM that is interestingly not dependent on PKB phosphorylation.

We then wondered whether the NES sequence of FOXO3 was necessary for the inhibitory effect of GILZ to occur. The FOXO3-TM NES sequence was invalidated by site-directed mutagenesis (Fig. 9B). Leucines 390 and 391 and isoleucine 394 of NES were replaced by alanines (FOXO3-TM-NESm). Using fluorescence microscopy, we observed that EGFP-FOXO3-TM-NESm was localized in the nucleus of HL-60 cells, in the absence and also in the presence of DsRed-GILZ (Fig. 9C), as previously demonstrated for leptomycin B treatment. We then

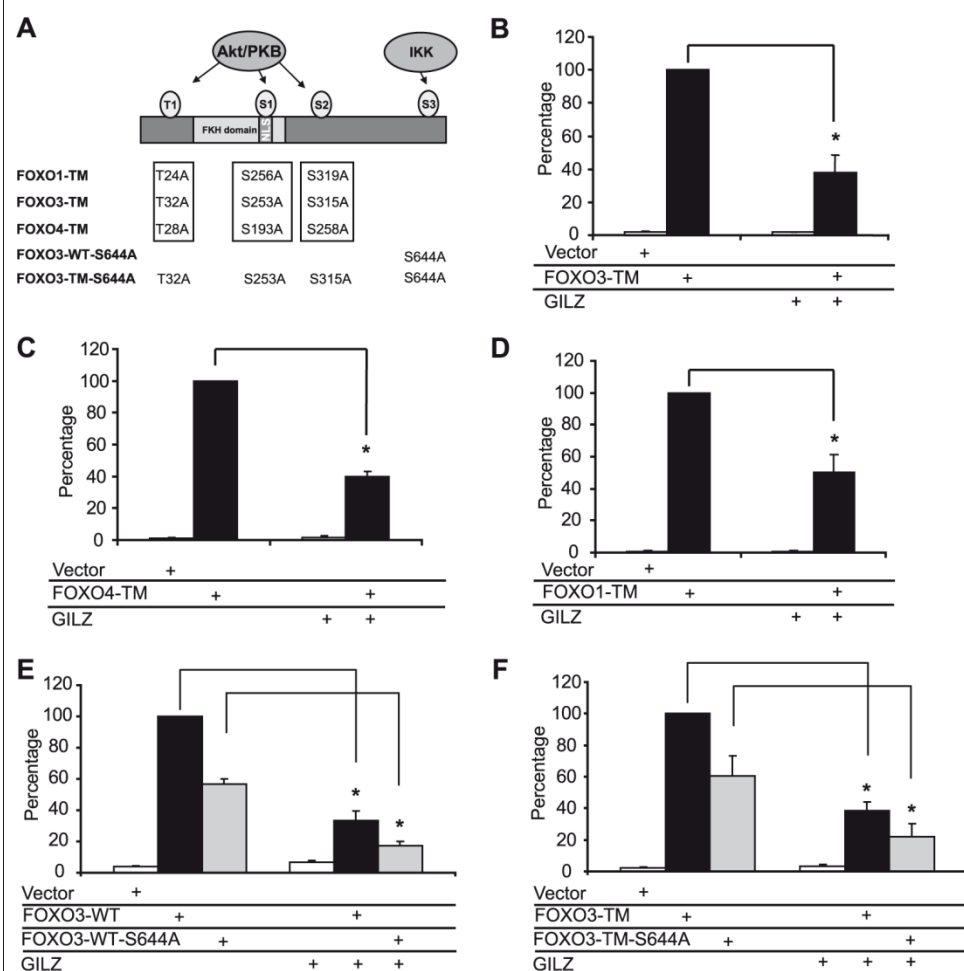


FIGURE 5. GILZ inhibition of FOXO-mediated transcription is not dependent on PKB and IKK phosphorylation sites. A, schematic representation of FOXO1-TM, FOXO3-TM, and FOXO4-TM. HL-60 cells were transiently transfected with reporter plasmid p3xIRS-MLP-Luc, with 5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc, and/or 0.5 μ g of pcDNA3-FOXO3-TM (B), 1 μ g of pMT2-FOXO4-TM (C), 0.5 μ g of pcDNA3-FOXO1-TM (D), 1 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT-S644A (E), 0.5 μ g of pcDNA3-FOXO3-TM-S644A (F), and transcriptional activity was analyzed after 24 h of culture. Results are expressed as the percentage of p3xIRS-MLP-Luc activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO-TM. Data represent the mean $\pm$ S.E. of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$. Error bars, S.E.M.

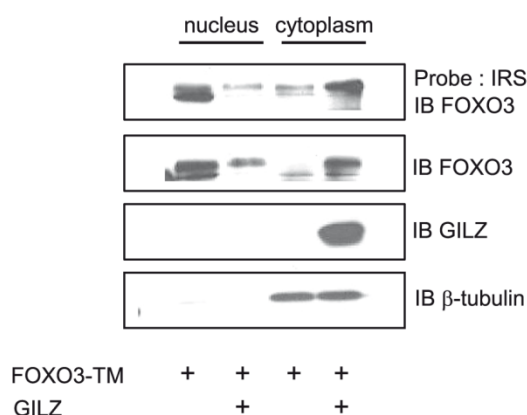


FIGURE 6. FOXO3 is mainly cytoplasmic in the presence of GILZ. HL-60 cells transfected with 5 μ g of pcDNA3-FOXO3-TM, with or without 10 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ were harvested 24 h after transfection, and nuclear and cytoplasmic extracts were performed. The 5'-biotinylated IRS probe coupled to streptavidine-agarose beads was incubated with cell extracts. Bound proteins were identified by Western blotting using the specific anti-FOXO3 antibody. A representative experiment of three is shown. IB, immunoblot.

compared the effect of GILZ on the transcriptional activity of FOXO3-TM-NESm and FOXO3-TM. HL-60 cells were transiently transfected with pcDNA3-FOXO3-TM, pcDNA3-FOXO3-TM-NESm, and/or pcDNA3-Myc-GILZ, along with the p3xIRS-MLP-Luc reporter plasmid, and the transcriptional activity was analyzed after 24 h culture (Fig. 9D). Interestingly, results showed that GILZ had no significant effect on the transcriptional activity of FOXO3-TM-NESm, suggesting that this functional export sequence played an important role in inhibition of FOXO3 by GILZ.

DISCUSSION

In the present study, we showed that GILZ inhibited expression of FOXO3 targets Bim and $p27^{KIP1}$ in CTLL-2 cells, as well as in HL-60 cells expressing exogenous FOXO3 and GILZ. We demonstrated that expression of GILZ in HL-60 cells inhibited FOXO3 and FOXO4 transcriptional activities measured with the natural promoters *BIM*, $p27^{KIP1}$, and *FASL*. GILZ also down-regulated FOXO1, FOXO3, and FOXO4 transcriptional activities, as measured with a synthetic promoter composed of 3 IRS sequences. These observations suggest that IRS responsive elements are sufficient for the inhibitory effect of GILZ to occur and that GILZ specifically

inhibits FOXO factors independently of the promoter context. These results also rule out a mechanism where GILZ-mediated inhibition would occur through interference with specific factors loading on the *BIM*, $p27^{KIP1}$, and *FASL* natural promoters. Indeed, the *BIM* promoter is known to be regulated by multiple signaling pathways, including those activating FOXO (5, 23), Myb (24), and AP-1 (25). Specific transcription factors have also been described to control *FASL* expression: Sp1 (26), NF-AT (27), Egr (early growth response protein) (28), IRF-1 (29), NF- κ B (30), and AP-1 (31). Among them, AP-1 and NF- κ B were reported to physically interact with GILZ, resulting in modulation of their transcriptional activities.

The ubiquitin-proteasome system has been shown to be critical for regulation of the levels of FOXO factors in cells. Indeed, PKB phosphorylation and polyubiquitylation of FOXO1 and FOXO3 lead to their degradation by the proteasome (10). Our results exclude an effect of GILZ on FOXOs degradation resulting from enhanced proteasomal degradation.

To analyze the mechanisms underlying the inhibition of FOXO factors by GILZ, we adopted a strategy to focus on

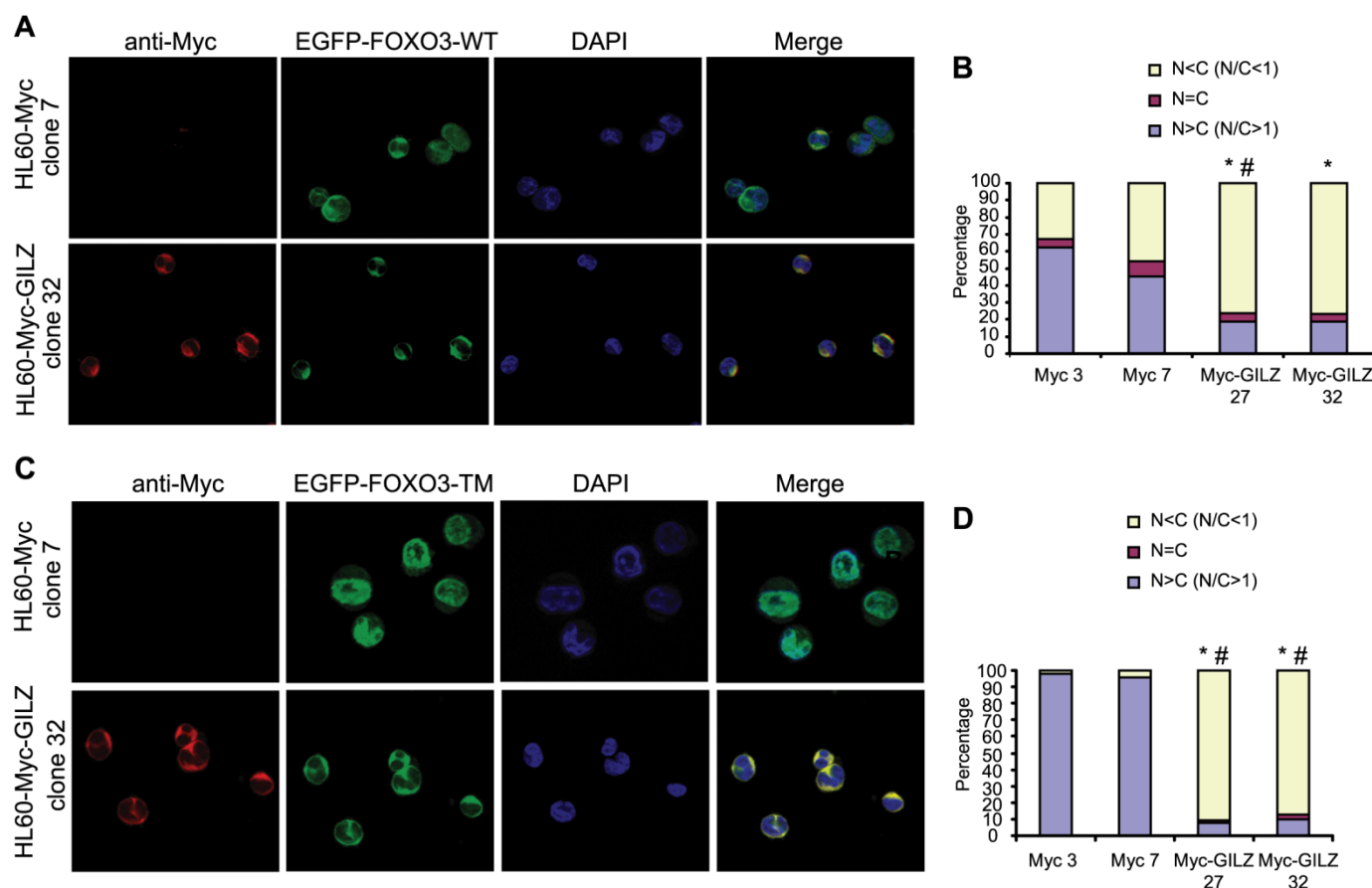


FIGURE 7. GILZ expression provokes FOXO3-WT and FOXO3-TM accumulation within the cytoplasm. HL-60-Myc and HL-60-Myc-GILZ clones were transiently transfected with 10 μ g of pEGFP-FOXO3-WT plasmid (A) or 10 μ g of pEGFP-FOXO3-TM plasmid (C). After overnight expression of exogenous proteins, cells were fixed in paraformaldehyde and stained with anti-Myc antibody and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclei detection. Cells were analyzed using fluorescence microscopy. 200 cells were scored according to the nuclear/cytoplasmic ratio of EGFP-FOXO3-WT (B) or EGFP-FOXO3-TM (D) fluorescence as described under "Experimental Procedures." Percentages of HL-60-Myc-GILZ clones 27 or 32 with a N/C < 1 were compared with percentages of HL-60-Myc control clones 3 or 7 with a N/C < 1. *, $p < 0.05$ compared with HL-60-Myc clone 3. #, $p < 0.05$ compared with HL-60-Myc clone 7.

FOXO3 and used the HL-60 hematopoietic cell line. In this model, GILZ inhibited the activity of natural or synthetic FOXO-responsive promoters in reporter tests systems, as well as the endogenous expression of Bim or p27^{KIP1}. In addition, FOXO3 was not detectable at the protein level in this cell line.

Results obtained with NES- and NLS-GILZ mutants showed that the GILZ inhibitory effect on FOXO3 required cytoplasmic localization of GILZ. This observation rules out a mechanism where GILZ would behave as a transcriptional repressor in the nucleus by binding to a tandem repeat of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) binding sites as previously described for the *PPAR* γ 2 promoter (32). We also found that in CTLL-2 and HL-60 cells GILZ was exclusively cytoplasmic, as evaluated either by immunofluorescence or Western blot detection after nuclear and cytoplasmic fractionation. The localization of GILZ is still a matter of debate. In the murine T-cell hybridoma 3DO transfected with a GILZ expression vector, GILZ was detected in the nucleus (15). In adipocytes, GILZ was described as a nuclear protein binding specifically to DNA (32). However, in COS-7 cells transfected with Myc-GILZ and analyzed by fluorescence microscopy, GILZ was found in the cytoplasm (33).

Our observations clearly showed that GILZ inhibited FOXO factors, independently of PKB and IKK phosphorylation sites.

This is a surprising result because inactivation of FOXO factors by PKB is the major mechanism described in the literature. FOXO3-WT-S644A and TM-S644A mutants displayed a lower transcriptional activity, which could be attributed to localization of the Ser-644 in the acidic transactivation domain in close proximity to the core region. This was also observed with a FOXO3 Δ Cter mutant in which a STOP codon was inserted after amino acid 604, deleting most of the transactivation domain (including Ser-644). Despite a weak transcriptional activity, this mutant was still inhibited by GILZ⁴ confirming that IKK was not involved in the mechanism of FOXO3 inhibition by GILZ. Nevertheless, FOXO isoforms are also subject to numerous other post-translational modifications that could be affected by GILZ. Recently, phosphorylation of FOXO3 on different regulatory sites by the AMP-activated protein kinase was shown to activate FOXO3 transcriptional activity without affecting its subcellular localization (34). MST1 has been described to interact with FOXO3 and phosphorylate Ser-207, promoting nuclear translocation (35). FOXO1 phosphorylation on Ser-249 by cyclin-dependent kinase 2 has also been shown to result in cytoplasmic local-

⁴ P. Latre de Late, unpublished data.

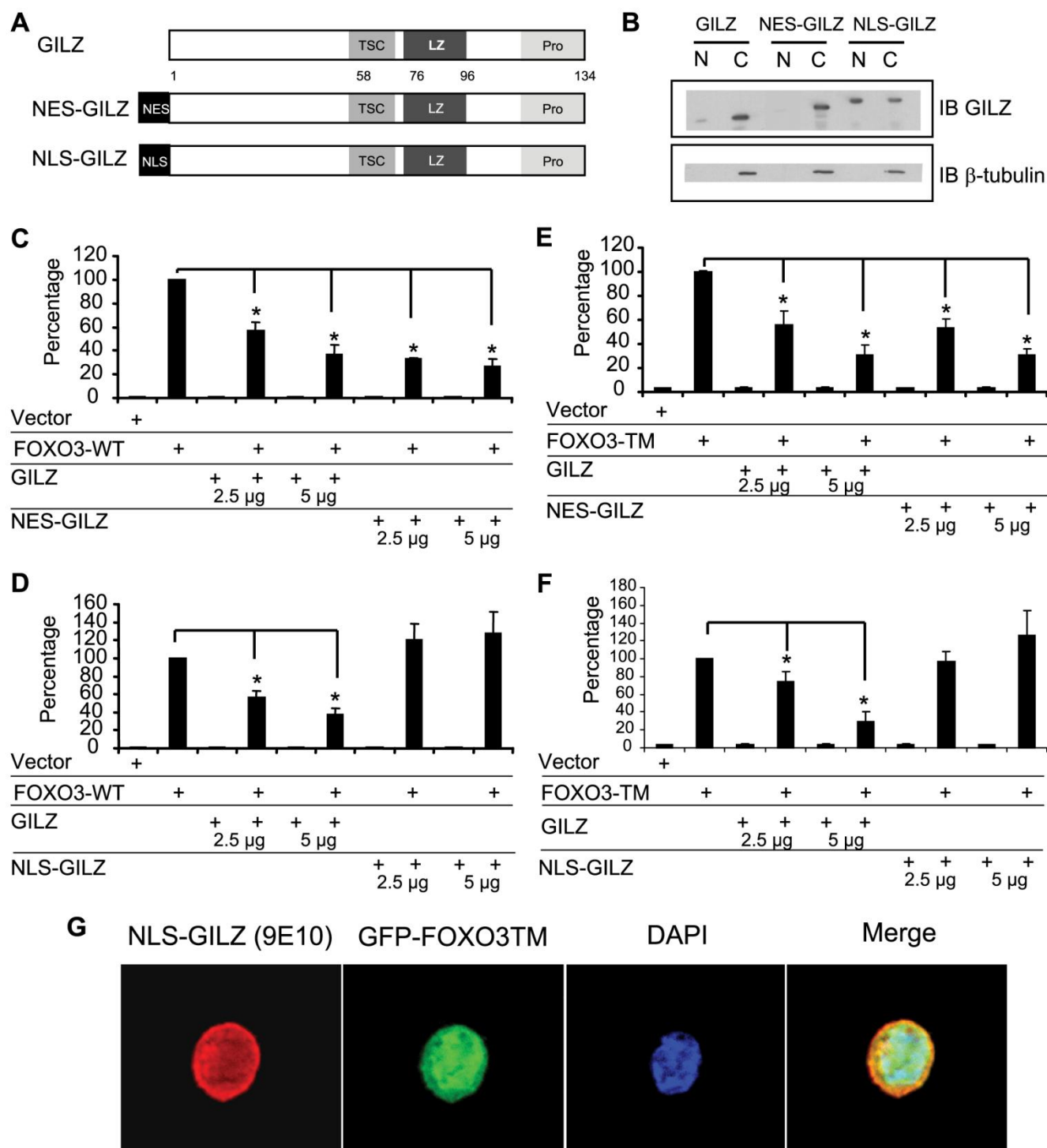


FIGURE 8. Localization of GILZ in the cytoplasm is necessary for inhibition of FOXO3-WT and FOXO3-TM transcriptional activities. *A*, schematic representation of NES-GILZ and NLS-GILZ constructions. *B*, expression of GILZ, NES-GILZ, and NLS-GILZ in the cytoplasm and nucleus of HL-60 cells. Western blot was performed using anti-GILZ and anti- β -tubulin antibody. *C*, cytoplasmic extract; *N*, nuclear extract. A representative experiment of three is shown. HL-60 cells were transiently transfected with the reporter plasmid p3xIR5-MLP-Luc (5 μ g) and/or increasing amounts of pcDNA3-Myc-GILZ (2.5 and 5 μ g), pcDNA3-Myc-NES-GILZ (2.5 and 5 μ g), and/or pcDNA3-FOXO3-WT (5 μ g) (*C*) or pcDNA3-FOXO3-TM (0.5 μ g) (*E*). HL-60 cells were transiently transfected with p3xIR5-MLP-Luc (5 μ g) and/or increasing amounts of pcDNA3-Myc-GILZ (2.5 and 5 μ g), pcDNA3-Myc-NLS-GILZ (2.5 and 5 μ g), and/or pcDNA3-FOXO3-WT (5 μ g) (*D*) or pcDNA3-FOXO3-TM (0.5 μ g) (*F*). Results are expressed as the percentage of p3xIR5-MLP-Luc activity with 100% representing the activity of FOXO3-WT or TM. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three independent experiments performed in duplicate. *, p < 0.05 compared with cells transfected with pcDNA3-FOXO3-TM. *G*, HL-60 cells were transiently transfected with pEGFP-FOXO3-TM plasmid (10 μ g) and pcDNA3-NLS-GILZ (10 μ g) or pcDNA3-Myc. After overnight expression of exogenous proteins, cells were fixed in paraformaldehyde and stained with the anti-Myc antibody and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were analyzed by fluorescence microscopy. Error bars, S.E.

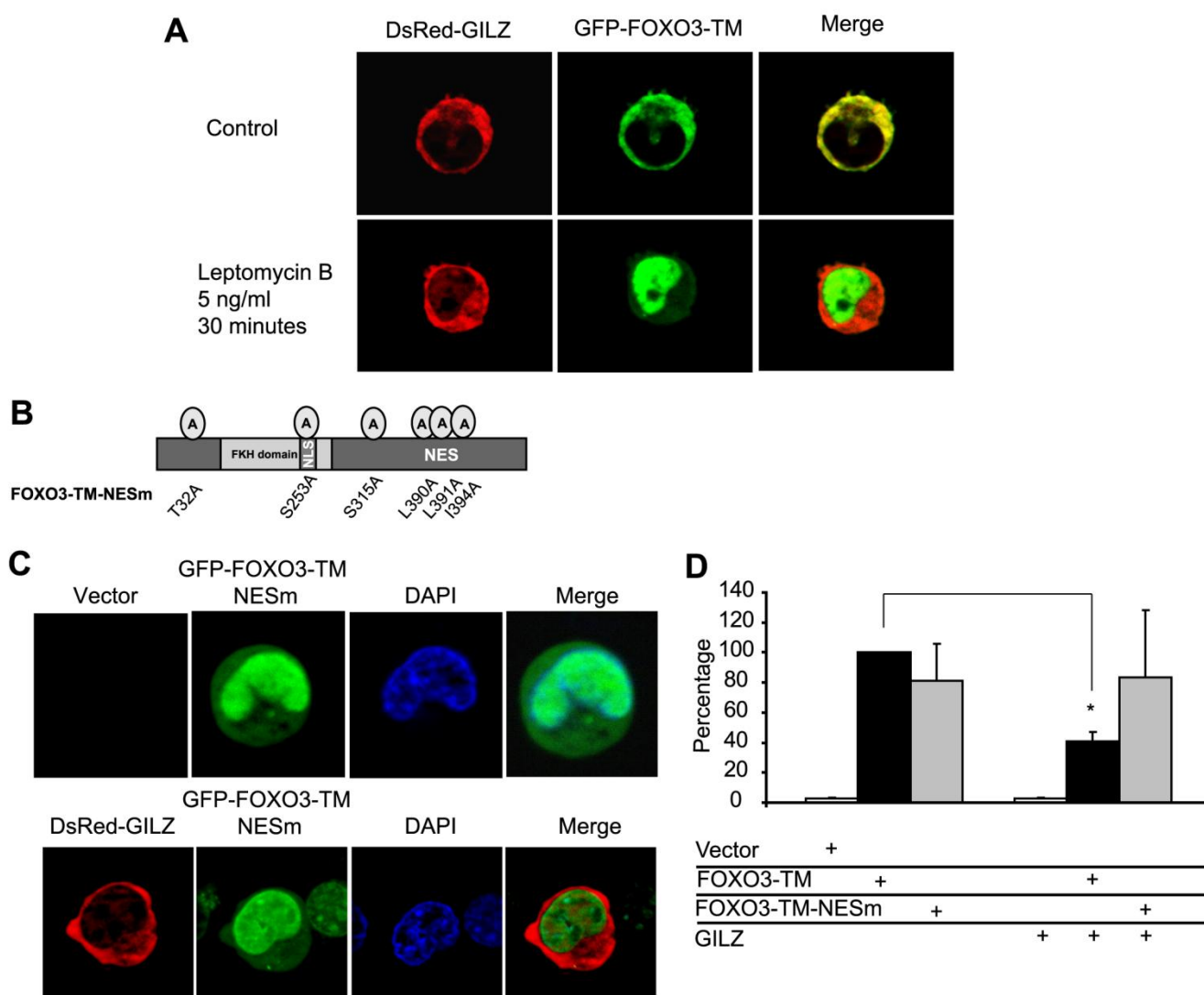


FIGURE 9. GILZ inhibition of FOXO3 activity requires a FOXO3 functional NES sequence. *A*, HL-60 cells were transiently transfected with pEGFP-FOXO3-TM plasmid (10 μ g) and pDsRed-GILZ (10 μ g). After overnight expression, cells were treated with or without 5 ng/ml of leptomycin B, maintained at 37 °C, and analyzed by confocal microscopy for 30 min. The images presented were acquired at 30 min after leptomycin B addition. *B*, schematic representation of FOXO3-TM-NESm. *C*, HL-60 cells were transiently transfected with pEGFP-FOXO3-TM-NESm plasmid (10 μ g) and pDsRed-GILZ (10 μ g) or pcDNA3-Myc. After overnight expression of exogenous proteins, cells were fixed in paraformaldehyde and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were analyzed by fluorescence microscopy. *D*, HL-60 cells were transiently transfected with the reporter plasmid p3xIRS-MLP-Luc, with either 0.5 μ g of pcDNA3-FOXO3-TM or pcDNA3-FOXO3-TM-NESm, 5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ or pcDNA3-Myc, and the transcriptional activity was analyzed after 24 h of culture. Results are expressed as the percentage of p3xIRS-MLP-Luc activity, with 100% representing the activity of the construct in the presence of FOXO3-TM. Data represent the mean $\pm$ S.E. of three independent experiments performed in duplicate. *, $p < 0.05$. Error bars, S.E.

ization and inhibition of FOXO1 transcriptional activity (36). Interestingly, in the experiments described in Fig. 6, FOXO3 was mainly cytoplasmic in the presence of GILZ and the cytoplasmic FOXO3 band was shifted, suggesting the existence of a phosphorylated form of FOXO3. Our hypothesis is that inhibition of FOXO3 by GILZ is due to relocation of FOXO3 to the cytoplasm. GILZ may promote phosphorylation of FOXO factors on regulatory sites affecting their nucleocytoplasmic localization.

GILZ expression in HL-60 cells transfected with EGFP-FOXO3-TM caused the cytoplasmic localization of FOXO3-TM, thus independently of PKB phosphorylation on Thr-32, Ser-253, and Ser-315. Cytoplasmic localization of transcription factors in the presence of GILZ was also described for NF- κ B (13), but as the consequence of altered nuclear translocation resulting from formation of GILZ-NF- κ B com-

plexes. The proline-rich as well as the leucine zipper regions of GILZ were shown to be crucial for this protein-protein interaction (14). GILZ can also form a ternary complex with activated Ras and Raf, resulting in inhibition of ERK and AP-1 signaling pathways (37). In summary, GILZ has been described to possess various dimerization partners resulting in modulation of transcription factor activity and signaling pathways (13, 37, 38). However, in HL-60 cells, FOXO3 and GILZ, although clearly colocalized in the cytoplasm, did not physically interact as assessed by coimmunoprecipitation experiments (supplemental Fig. S2) or by fishing with a GST-GILZ fusion protein (data not shown) despite high levels of GILZ and FOXO3 expression. As a positive control, we were able to detect in the same experimental conditions the previously described interaction of FOXO3 with 14-3-3. Altogether, our results suggest that GILZ would not directly

interact with FOXO3, but could rather interact and/or modulate the activity of another partner involved in regulation of FOXO3 localization.

The mechanism of inhibition could rely on a cytoplasmic retention, a reduced import, or an accelerated export of FOXO3 in the presence of GILZ. Our results obtained with the FOXO3-TM-NESm mutant favor a mechanism where GILZ would promote and/or accelerate the export of FOXO3 from the nucleus to the cytoplasm. When sequestered in the nucleus by invalidation of its export sequence, FOXO3 transcriptional activity was preserved despite the presence of GILZ. Upon inhibition of FOXO3 nuclear export by leptomycin B, import of FOXO3 was rapidly completed, ruling out a role for GILZ on FOXO3 nuclear import and consistent with the absence of physical interaction between GILZ and FOXO3. GILZ could modulate Crm1-NES interactions either through promotion of conformational changes in the NES region or by enhancing the affinity of Crm1 for FOXO3. This could occur through post-translational modifications such as phosphorylations. For example, Engel *et al.* (39) have observed that the MAPK AP kinase 2 is phosphorylated in the nucleus and is rapidly translocated to the cytoplasm due to unmasking of its NES upon conditions of stress such as ultraviolet light or H₂O₂. It is interesting to note that our results were obtained with FOXO3-TM, suggesting that these post-translational modifications would occur on residues distinct from the classical PKB phosphorylation sites. In support for this hypothesis, Clavel *et al.* (40) recently described that activation of the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) signaling pathway in C2C12 muscle cells could induce nuclear export of FOXO3 through Crm1 and independently of PKB.

Our results suggest that GILZ is a natural inhibitor of FOXO factor transcriptional activities in hematopoietic cells with an original mechanism of action. Our hypothesis is an inhibitory effect of GILZ requiring its cytoplasmic localization and promoting nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner. The regulation of nucleocytoplasmic distribution of transcription factors is emerging as one of the most efficient mechanisms to adjust gene expression to the cell environment. This mechanism allows to finely control access of the transcriptional regulators to their target genes as shown here with FOXO factors. More importantly, these findings strongly suggest that expression of GILZ could lead to the general inhibition of FOXO signaling pathways affecting functions such as cell cycle regulation or cell death.

Acknowledgments—We thank Marine Petitpretz, Angélique Lebouvier, and Stefanie Burleson for help with GILZ and FOXO3 mutant testing. A special thanks to Christophe Klein for assistance in fluorescence images analyses.

REFERENCES

1. Huang, H., and Tindall, D. J. (2007) *J. Cell Sci.* **120**, 2479–2487
2. Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., and Mori, N. (2000) *Biochem. J.* **349**, 629–634
3. Stahl, M., Dijkers, P. F., Kops, G. J., Lens, S. M., Coffey, P. J., Burgering, B. M., and Medema, R. H. (2002) *J. Immunol.* **168**, 5024–5031

4. You, H., Pellegrini, M., Tsuchihara, K., Yamamoto, K., Hacker, G., Erlacher, M., Villunger, A., and Mak, T. W. (2006) *J. Exp. Med.* **203**, 1657–1663
5. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999) *Cell* **96**, 857–868
6. Mei, Y., Zhang, Y., Yamamoto, K., Xie, W., Mak, T. W., and You, H. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5153–5158
7. Lin, L., Hron, J. D., and Peng, S. L. (2004) *Immunity* **21**, 203–213
8. Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., Armstrong, S. A., Passequé, E., DePinho, R. A., and Gilliland, D. G. (2007) *Cell* **128**, 325–339
9. Paik, J. H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J. W., Carrasco, D. R., Jiang, S., Gilliland, D. G., Chin, L., Wong, W. H., Castrillon, D. H., and DePinho, R. A. (2007) *Cell* **128**, 309–323
10. Plas, D. R., and Thompson, C. B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12361–12366
11. Hu, M. C., Lee, D. F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J. Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R., and Hung, M. C. (2004) *Cell* **117**, 225–237
12. Mittelstadt, P. R., and Ashwell, J. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29603–29610
13. Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., and Riccardi, C. (2001) *Blood* **98**, 743–753
14. Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G., and Riccardi, C. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, 517–528
15. D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., and Riccardi, C. (1997) *Immunity* **7**, 803–812
16. Asselin-Labat, M. L., Biola-Vidammet, A., Kerbrat, S., Lombès, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2005) *Mol. Endocrinol.* **19**, 1752–1764
17. Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M. C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., Peuchmaur, M., Riccardi, C., and Emilie, D. (2003) *Blood* **101**, 729–738
18. Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A. L., Christiansen, S. C., and Zuraw, B. L. (2007) *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 115–122
19. Asselin-Labat, M. L., David, M., Biola-Vidammet, A., Lecoeuche, D., Zennaro, M. C., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2004) *Blood* **104**, 215–223
20. Biola, A., Lefebvre, P., Perrin-Wolff, M., Sturm, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2001) *Mol. Endocrinol.* **15**, 1062–1076
21. Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 9138–9148
22. Shin, I., Bakin, A. V., Rodeck, U., Brunet, A., and Arteaga, C. L. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 3328–3339
23. Gilley, J., Coffey, P. J., and Ham, J. (2003) *J. Cell Biol.* **162**, 613–622
24. Biswas, S. C., Liu, D. X., and Greene, L. A. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 8349–8358
25. Biswas, S. C., Shi, Y., Sproul, A., and Greene, L. A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 29368–29374
26. Xiao, S., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S. T. (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**, 3339–3348
27. Kasibhatla, S., Genestier, L., and Green, D. R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 987–992
28. Mittelstadt, P. R., and Ashwell, J. D. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3744–3751
29. Chow, W. A., Fang, J. J., and Yee, J. K. (2000) *J. Immunol.* **164**, 3512–3518
30. Savickiene, J., Treigyte, G., Pivoriunas, A., Navakasieniene, R., and Magnusson, K. E. (2004) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1030**, 569–577
31. Baumann, S., Hess, J., Eichhorst, S. T., Krueger, A., Angel, P., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003) *Oncogene* **22**, 1333–1339
32. Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S., and Cao, X. (2003) *EMBO Rep.* **4**, 374–380
33. Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., and Riccardi, C. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7929–7941
34. Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., and Brunet, A. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 30107–30119
35. Lehtinen, M. K., Yuan, Z., Boag, P. R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E. B.,

- DiBacco, S., de la Iglesia, N., Gygi, S., Blackwell, T. K., and Bonni, A. (2006) *Cell* **125**, 987–1001
36. Huang, H., Regan, K. M., Lou, Z., Chen, J., and Tindall, D. J. (2006) *Science* **314**, 294–297
37. Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., and Riccardi, C. (2007) *J. Clin. Invest.* **117**, 1605–1615
38. Redjimi, N., Gaudin, F., Touboul, C., Emilie, D., Pallardy, M., Biola-Vidamment, A., Fernandez, H., Prévot, S., Balabanian, K., and Machelon, V. (2009) *Mol. Cancer* **8**, 83–97
39. Engel, K., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (1998) *EMBO J.* **17**, 3363–3371
40. Clavel, S., Siffroi-Fernandez, S., Coldefy, A. S., Boulukos, K., Pisani, D. F., and Dérijard, B. (2010) *Mol. Cell. Biol.* **30**, 470–480

Supplemental Data

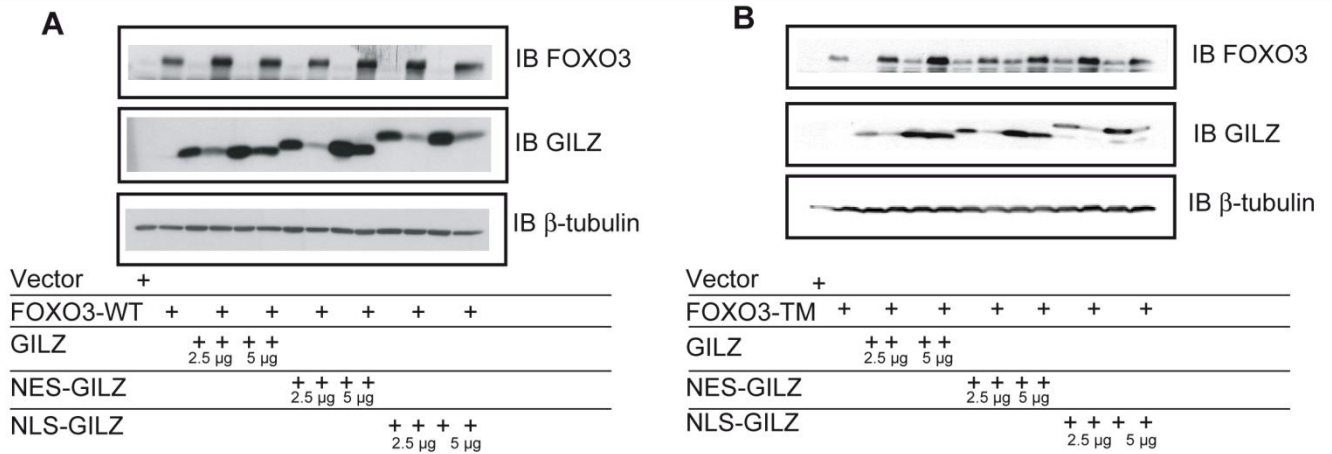


Fig S1. Expression of FOXO3 in the presence of NLS-GILZ or NES-GILZ.

HL-60 cells were transiently transfected with increasing amounts of pcDNA3-Myc-GILZ (2.5 μ g and 5 μ g) or pcDNA3-Myc-NLS-GILZ (2.5 μ g and 5 μ g) and/or pcDNA3-FOXO3-WT (5 μ g) (**A**) or pcDNA3-FOXO3-TM (0.5 μ g) (**B**). Western blot analysis was performed using anti-FOXO3, anti-GILZ or anti- β -tubulin antibodies.

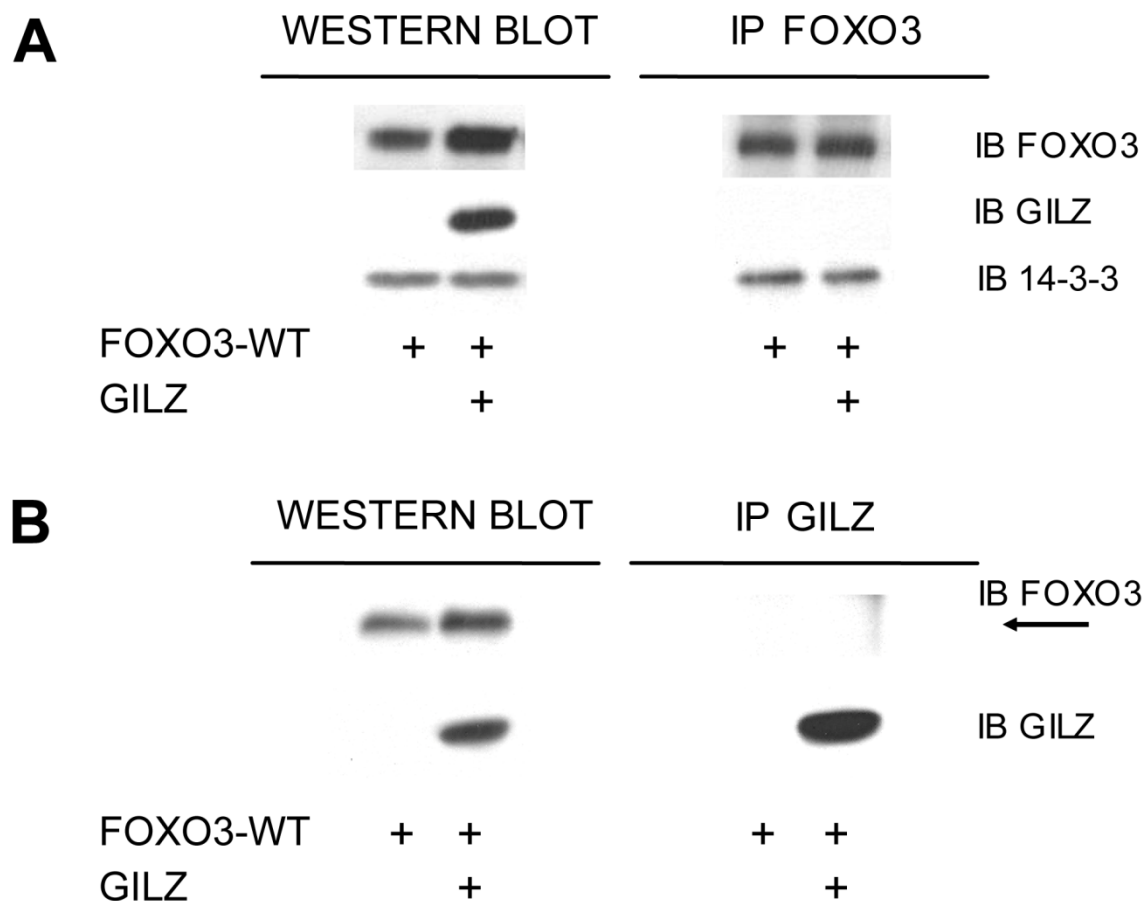


Fig S2. GILZ does not physically interact with FOXO3 in HL-60 cells. HL-60 cells were transfected with 2.5 μ g of pcDNA3-Myc-GILZ and/or 5 μ g of pcDNA3-FOXO3-WT plasmids and harvested for lysis after overnight culture. Immunoprecipitation was performed with anti-FOXO3 (**A**) or anti-GILZ (**B**) antibodies. Immunoprecipitates were loaded for SDS/PAGE and transferred for western blotting with anti-GILZ or anti-FOXO3 antibodies respectively. Representative experiment out of three.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion

L'objectif général de ce travail a consisté à étudier les fonctions des protéines de la famille TSC-22D au cours de l'apoptose des lymphocytes T induite par la déprivation en IL-2.

Premièrement, nous avons montré que TSC-22 augmentait l'apoptose de la lignée cellulaire CTLL-2 déprivée en IL-2, en diminuant l'expression de la protéine anti-apoptotique, GILZ. Ensuite, nous avons étudié le mécanisme par lequel GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription FOXO3. Enfin, nous avons débuté l'étude du mécanisme par lequel TSC-22 régule l'expression de GILZ.

1. TSC-22 augmente l'apoptose des lymphocytes T déprivés en IL-2.

GILZ et TSC-22 sont deux protéines qui appartiennent à la famille de protéines TSC-22D. GILZ a été décrite comme ayant une activité anti-apoptotique dans la lignée cellulaire CTLL-2 déprivée en IL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Quant à lui, TSC-22 a été décrit comme protéine pro-apoptotique dans divers types cellulaires, non hématopoïétiques (Ohta *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2008). Au cours de ce travail, nous souhaitons déterminer les rôles respectifs des protéines TSC-22 et GILZ lors de l'apoptose des cellules hématopoïétiques déprivées en facteurs de croissance.

Pour débiter ce travail, nous avons souhaité vérifier que TSC-22 était exprimé dans le tissu et les cellules hématopoïétiques. Nous voulions également savoir si GILZ et TSC-22 pouvaient être exprimés dans les mêmes tissus. L'analyse de l'ARNm de différents tissus humains a permis de montrer que les ARNm de *gilz* et *tsc-22* étaient tous deux présents dans les tissus testés, et notamment la rate et le thymus. Des études visant à déterminer la répartition tissulaire des ARNm de *gilz* ou *tsc-22* chez l'homme ou chez la souris avaient également montré qu'ils étaient exprimés dans tous les tissus testés (Shibanuma *et al.*, 1992; Hamil and Hall 1994; D'Adamio *et al.*, 1997).

Par ailleurs, nous avons détecté les ARNm de *tsc-22* et *gilz* dans la plupart des cellules hématopoïétiques humaines et murines testées, dont les lymphocytes T. Au contraire, l'étude de Hamil *et al.* avait montré que l'ARNm de *tsc-22* était absent des leucocytes issus de sang périphérique humain (Hamil and Hall 1994). L'analyse des lignées cellulaires hématopoïétiques a permis de montrer que l'ARNm de *tsc-22* était présent dans la majorité d'entre elles, à l'exception des lignées cellulaires CTLL-2 et NK-L. Il se trouve, en outre, que

GILZ n'est pas exprimé dans la majorité des lignées cellulaires testées qui sont dépendantes de l'IL-2 pour leur survie.

Nous avons donc choisi d'étudier le rôle des protéines TSC-22D en utilisant la lignée cellulaire CTLL-2, à partir de laquelle nous avons produit des transfectants stables surexprimant soit GILZ, soit TSC-22.

Nous avons montré que la surexpression de TSC-22 dans les cellules CTLL-2 induisait une augmentation de l'apoptose des cellules déprivées en facteur de croissance. L'analyse de l'apoptose a été réalisée par deux techniques différentes, mais complémentaires afin de bien caractériser cette mort cellulaire. En effet, le marquage des cellules avec l'Annexine-V et le 7-AAD permet d'identifier les cellules ayant externalisé leurs phosphatidylsérines et dont les membranes sont perforées, c'est-à-dire les cellules qui entrent en apoptose puis en nécrose secondaire. La quantification des cellules en SubG1 permet de déterminer le pourcentage de cellules qui possèdent une quantité d'ADN inférieure à la quantité présente dans les cellules en phase G0/G1, c'est-à-dire les cellules se trouvant dans les phases tardives de l'apoptose.

Afin de déterminer si TSC-22 augmentait uniquement l'apoptose induite par la déprivation en IL-2 des lymphocytes T, nous avons traité les cellules CTLL-2 avec des molécules aux propriétés pro-apoptotiques bien connues, la staurosporine et la dexaméthasone. La staurosporine est un inhibiteur de la protéine kinase C (PKC). La dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, intervient par différents mécanismes pour réguler l'apoptose. Ainsi, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et des protéines pro-apoptotiques BIM et PUMA est régulée positivement. Les cathepsines, qui sont des protéases, sont relarguées et induisent le clivage de nombreuses molécules. La signalisation calcique, impliquée dans les mécanismes régulant la prolifération et la survie cellulaire est inhibée. Les récepteurs des glucocorticoïdes se lient à la membrane de la mitochondrie, perturbant ainsi le potentiel membranaire mitochondrial (Herold *et al.*, 2006; Zen *et al.*, 2011). Nous avons donc montré que la présence de TSC-22 n'augmentait pas l'apoptose des clones CTLL-2 induite par ces deux molécules. Ce résultat suggère donc que TSC-22 augmente spécifiquement l'apoptose des lymphocytes T induite par la déprivation en IL-2.

La mort cellulaire induite dans ces cellules déprivées en IL-2 est connue pour impliquer la voie intrinsèque de l'apoptose (Tait and Green 2010).

Nous avons, tout d'abord, vérifié que l'apoptose induite par TSC-22 était médiée par l'activation des caspases. L'utilisation d'un inhibiteur pan-caspases, le QVD-OPH, a permis de montrer que l'apoptose induite par TSC-22 était totalement inhibée. Nous avons ensuite analysé l'activation des caspases par western-blot : la progression de leur activation est détectable grâce à l'apparition successive des différents fragments de clivage des caspases. Nous avons ainsi démontré que les caspases-9 et -3 étaient activées dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2 et que cette activation était accrue dans les clones surexprimant TSC-22. Le fait que la caspase-9 soit activée démontre que la voie mitochondriale de l'apoptose est impliquée dans cette mort cellulaire.

TSC-22 a été décrit précédemment comme un inducteur de l'apoptose, dans la lignée cellulaire HSC39, issue d'un carcinome gastrique humain, ou dans des clones de la lignée cellulaire TYS, issue d'une tumeur de glande salivaire humaine, traités par des médicaments anti-cancéreux (Ohta *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 2000). L'induction de l'apoptose caspase-dépendante a également été observée dans la lignée cellulaire SKOV-3, lors de la surexpression de TSC-22 (Lee *et al.*, 2008). Cependant, dans tous ces modèles, le ou les mécanisme(s) induisant l'augmentation de l'activité de la caspase-3 n'ont pas été décrits.

Le potentiel apoptotique des autres membres de la famille TSC-22D a également été étudié. Ainsi, la protéine THG-1 ou TSC-22D4-1, dont l'expression est induite dans les cellules de la couche granulaire du cervelet murin, augmente leur apoptose induite par la déprivation en K⁺ (Canterini *et al.*, 2009).

La protéine GILZ ou TSC-22D3-2 a été décrite comme anti-apoptotique dans les lymphocytes T déprivés en IL-2, mais comme protéine pro-apoptotique dans des thymocytes murins surexprimant GILZ (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Delfino *et al.*, 2004).

Enfin, une étude réalisée dans la levure a permis de mettre en évidence une séquence de 86 acides aminés issue de TSC-22 humain qui permettrait de protéger les levures de l'apoptose induite par l'eau oxygénée ou par la surexpression de Bax, une protéine de la famille Bcl-2 (Khoury *et al.*, 2008).

Les protéines de la famille Bcl-2, telles que BIM, ont été décrites pour être responsables de la perturbation du potentiel mitochondrial, du relarguage de molécules pro-apoptotiques et par conséquent de l'activation des caspases (Tait and Green 2010). Nous avons choisi de ne pas nous attarder sur les différentes étapes de la cascade apoptotique, telles que la relocalisation à la mitochondrie des protéines de la famille Bcl-2 ou le relarguage du

cytochrome C hors de la mitochondrie, mais nous avons choisi d'étudier l'effet de TSC-22 sur l'expression de BIM, essentiellement parce que GILZ est un inhibiteur de l'expression de BIM.

Trois isoformes de BIM (BIM EL, BIM L, et BIM S) ont été décrites dans les cellules murines (O'Connor *et al.*, 1998). Les formes EL et L sont exprimées dans les lymphocytes T à l'état basal, mais sont liées aux microtubules ou à la mitochondrie, et sont donc inactives (Zhu *et al.*, 2004). La kinase ERK, activée en présence de facteurs de croissance, phosphoryle BIM EL, induisant sa dégradation par le protéasome (Ley *et al.*, 2003). Cependant, suite à la déprivation en facteurs de croissance, ces isoformes ne sont plus phosphorylées par ERK, mais peuvent être phosphorylées par la kinase JNK et exercer leur pouvoir pro-apoptotique (Putchá *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'expression de BIM S, quasiment indétectable à l'état basal dans les cellules, est régulée uniquement de façon transcriptionnelle.

Nos travaux ont permis de montrer que l'expression protéique de ces trois isoformes, induite au cours de la déprivation en IL-2, était augmentée en présence de TSC-22. L'analyse de l'expression de leurs ARNm a permis de démontrer que seul l'ARNm de *bim s* était augmenté significativement en présence de TSC-22. Notre résultat suggère donc que TSC-22 est capable d'augmenter l'expression des isoformes de BIM induite lors de la déprivation en IL-2 des CTLL-2 à la fois par une régulation transcriptionnelle et par une régulation post-traductionnelle. TSC-22 induit ainsi la transcription de *bim s*, l'isoforme de BIM ayant le plus fort pouvoir pro-apoptotique. Il augmente également l'expression des protéines BIM EL et BIM L, probablement en inhibant leur dégradation par le protéasome, du fait de l'absence de phosphorylation par ERK lors de la déprivation en IL-2.

Au cours de ce travail, nous avons donc montré que TSC-22 était capable d'augmenter l'apoptose en régulant positivement les mécanismes de la voie intrinsèque mis en place lors de la déprivation en IL-2 des lymphocytes T. Ainsi, l'expression des protéines BIM est augmentée, conduisant à une activation accrue des caspases.

2. TSC-22 diminue l'expression de GILZ induite lors de la déprivation en IL-2.

Précédemment, au sein du laboratoire, il a été démontré que l'expression de GILZ induite lors de la déprivation en IL-2 des CTLL-2 permettait de diminuer l'expression de BIM et par conséquent de retarder l'entrée en apoptose des cellules (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous avons montré que TSC-22 induisait l'apoptose des cellules CTLL-2 en régulant

positivement l'expression de BIM. C'est pourquoi, nous avons analysé l'expression de GILZ dans les clones CTLL-2, afin de déterminer si la régulation de GILZ par TSC-22 pouvait participer à l'accélération de l'apoptose induite par TSC-22.

Nous avons mis en évidence une plus faible induction de l'expression de la protéine GILZ dans les clones TSC-22, par rapport aux clones contrôles. Cette régulation protéique pourrait être due à une diminution de la transcription de *gilz* ou à une augmentation de la dégradation de la protéine GILZ. Nous avons tout d'abord analysé l'expression de l'ARNm de *gilz*, et nous avons montré que son induction était significativement plus faible à 8h et 12h après la déprivation en IL-2. La régulation négative de l'ARNm de *gilz* en présence de TSC-22 peut être due à deux mécanismes différents, soit à une diminution de la stabilité de l'ARNm de *gilz*, soit à une diminution de la transcription de *gilz*.

L'étude de la stabilité de l'ARNm de *gilz* dans les clones CTLL-2 contrôles et dans les clones surexprimant TSC-22 n'a démontré aucune différence de la stabilité de l'ARNm de *gilz* entre ces différents clones. Il paraît tout de même intéressant de noter que dans les clones CTLL-2 contrôles, la demi-vie de l'ARNm de *gilz* est très courte, soit 2 à 2,5 heures. C'est une donnée que nous avons supposée jusqu'à présent, étant donné la cinétique d'induction de l'ARNm de *gilz* au cours de la déprivation en IL-2 des CTLL-2, mais nous ne l'avons jamais calculée (Asselin-Labat *et al.*, 2004).

Nous devons donc réaliser des tests d'activité transcriptionnelle afin de confirmer que la réduction de l'expression de l'ARNm de *gilz* est due à une inhibition de la transcription de *gilz* par TSC-22.

Le promoteur de *gilz* a été récemment cloné au sein du laboratoire (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Ce promoteur naturel contient des séquences de fixation pour différents facteurs de transcription (figure 9), parmi lesquels FOXO3, et est activé lors de la déprivation en interleukine-2 des cellules CTLL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Le plasmide rapporteur composé d'une grande majorité du promoteur de *gilz*, le plasmide p1940-Luc, pourrait donc être utilisé pour réaliser des tests d'activité transcriptionnelle dans la lignée cellulaire CTLL-2 déprivée en IL-2. Des quantités croissantes de plasmide codant pour TSC-22 pourraient être transfectées dans ces cellules afin de déterminer son effet sur l'induction de la transcription de *gilz* dans les cellules CTLL-2. Des mutations des sites FHRE ont également été effectuées sur le plasmide p1940-Luc, permettant de mettre en évidence l'importance du facteur de transcription FOXO3 dans l'induction de la transcription de *gilz* (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Des tests d'activité transcriptionnelle réalisés à l'aide du plasmide p1940-Luc muté sur les séquences FHRE permettraient de déterminer si TSC-22 régule la transcription de *gilz*,

directement ou indirectement *via* FOXO3.

Un schéma récapitulatif des mécanismes régulés par les protéines GILZ et TSC-22 dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2 est présenté ci-dessous (figure 45).

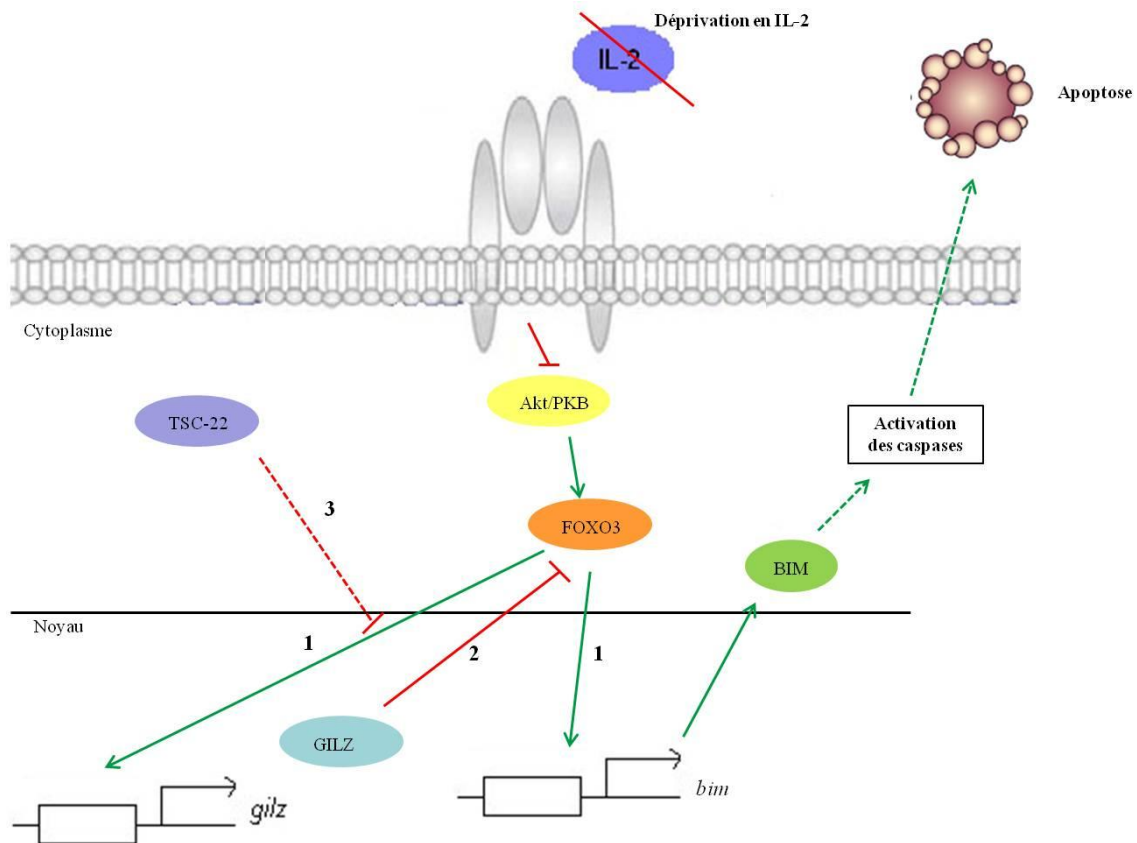


Figure 45. Schéma récapitulatif des mécanismes régulés par GILZ et TSC-22 au cours de l'apoptose des cellules CTLL-2 déprivées en IL-2. Les flèches vertes correspondent à une activation et les flèches rouges à une inhibition. Les flèches pleines représentent un mécanisme direct et les flèches en pointillés un mécanisme indirect. (1) Le facteur de transcription FOXO3, activé par la déprivation en IL-2, induit la transcription de *bim*, résultant en l'activation des caspases et l'apoptose, et la transcription de *gilz*. (2) GILZ ainsi exprimé est ensuite capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXO3. (3) TSC-22 est capable d'inhiber l'induction de la transcription de *gilz*.

Suite à la démonstration de l'effet de TSC-22 sur l'expression de GILZ et l'apoptose induite par la déprivation en IL-2, nous souhaitons surexprimer GILZ dans les clones CTLL-2 exprimant TSC-22, afin de vérifier que l'activité de TSC-22 était contrecarrée par la présence de GILZ. Nous souhaitons, en outre, que l'expression de GILZ ne puisse pas être régulée par TSC-22.

Différentes stratégies ont été mises en place, qui se sont avérées infructueuses.

Nous avons essayé de surexprimer GILZ par transfection transitoire par électroporation des clones TSC-22 avec les plasmides pcDNA3-Myc ou pcDNA3-Myc-GILZ. La quantification de l'apoptose de ces cellules transfectées n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les cellules exprimant ou non GILZ (résultat non montré). Nous avons supposé que cette absence de différence pouvait être imputable à la mortalité des cellules induite par l'électroporation.

Par ailleurs, nous avons essayé de surexprimer GILZ de manière inductible dans les clones CTLL-2 TSC-22. Nous avons donc construit un plasmide pTRIPZ-GILZ, composé de deux promoteurs. Le promoteur provenant du promoteur de l'ubc (Ubiquitin C) permet à la fois l'expression du gène de résistance à la puromycine et l'expression de la protéine rtTA (tetracycline Transactivator) ; le second promoteur, qui est inductible par la protéine rtTA, uniquement en présence de doxycycline, induit l'expression de GILZ. Il s'agit donc d'un système inductible de type Tet-On, pour lequel les promoteurs sont présents sur le même plasmide. L'expression de GILZ a été observée en présence de doxycycline dans les clones CTLL-2 TSC-22 transfectés transitoirement avec le plasmide pTRIPZ-GILZ. Cependant, les transfectants stables CTLL-2 TSC-22 pTRIPZ-GILZ que nous avons obtenus après dilution limite n'exprimaient pas GILZ (résultat non montré). Nous avons également observé que la protéine rtTA n'était pas exprimée dans ces mêmes clones (résultat non montré). Nous pouvons alors supposer que TSC-22 régulerait l'activité du promoteur UBC.

Une autre stratégie visant à surexprimer GILZ consistait à utiliser une protéine de fusion TAT-GILZ, composée d'un peptide issu de la protéine TAT du VIH (Transactivator of Transcription), et permettant à la protéine de fusion de pénétrer dans la cellule. Ce type de protéine a été utilisé dans des travaux publiés par l'équipe de Riccardi (Delfino *et al.*, 2004). L'apoptose de cellules issues de leucémies chroniques induite par une protéine de fusion TAT-FOXO3 a également été étudiée (Essafi *et al.*, 2011). Le plasmide codant pour la protéine de fusion TAT-HA-GILZ a été construit lors de mon stage de Master 2. Nous souhaitons alors surexprimer GILZ dans les lymphocytes T primaires murins. Une expérience préliminaire n'a pas permis de mettre en évidence un effet de la protéine TAT-GILZ sur l'apoptose des clones CTLL-2 contrôle ou TSC-22 (résultat non montré). La TAT-contrôle induisait, par contre, une augmentation de l'apoptose des clones CTLL-2 TSC-22 (résultat non montré).

Nous avons donc montré que TSC-22 augmente l'apoptose des cellules CTLL-2 déprivées en IL-2. TSC-22 augmente en effet l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, car nous avons observé une régulation positive de l'expression de la protéine BIM appartenant à la famille Bcl-2, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'activation des caspases-9 et -3. Nous avons montré que l'expression de la protéine GILZ, connue pour inhiber l'expression de BIM, était régulée négativement par TSC-22. L'originalité de notre travail réside donc dans le fait que nous avons montré que la protéine TSC-22 augmente l'apoptose en régulant l'expression d'une autre protéine de la même famille, GILZ, qui est anti-apoptotique.

Une telle interaction entre deux protéines de la famille TSC-22D n'avait jamais été décrite jusqu'à présent. Ces deux protéines, GILZ et TSC-22, possédant toutes des domaines communs, régulent différemment la survie cellulaire.

3. TSC-22 régule-t-il l'activité de FOXO3 ?

Nous avons donc montré que TSC-22 régule négativement l'expression de GILZ induite dans les lymphocytes T déprivés en IL-2.

D'une part, nous avons précédemment démontré que le facteur de transcription FOXO3, activé lors de la déprivation en IL-2, était responsable de l'induction de l'expression de GILZ dans les lymphocytes T déprivés en IL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous avons, en outre, décrit que GILZ était capable de réguler l'activité transcriptionnelle de FOXO3 (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Latre de Late *et al.*, 2010).

D'autre part, les protéines GILZ et TSC-22 présentent des séquences très homologues.

C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que TSC-22 pouvait réguler l'activité transcriptionnelle de FOXO3 et donc l'expression de GILZ.

L'étude de l'effet de TSC-22 sur l'activité de FOXO3 a été effectuée d'une part en analysant son activité transcriptionnelle, et d'autre part en étudiant sa localisation subcellulaire en présence de TSC-22.

Nous avons choisi de réaliser ces tests d'activité transcriptionnelle dans les cellules HL-60, en surexprimant la protéine FOXO3. Il s'agit d'un modèle que nous connaissons bien et que nous avons utilisé dans un article publié récemment (Latre de Late *et al.*, 2010). Cette lignée cellulaire HL-60 est indépendante de toute cytokine pour sa prolifération et la protéine

FOXO3, ainsi que les autres protéines de la famille FOXO ne sont pas exprimées dans cette lignée. Le plasmide rapporteur utilisé, p3xIRS-MLP-Luc, comprend un promoteur composite composé de trois copies de la séquence de réponse à l'insuline (IRS) en amont du Major Late Promoter (MLP) de l'adénovirus (Daitoku *et al.*, 2004). Ce plasmide présente donc l'avantage de n'être régulé que par les facteurs de transcription FOXO3, contrairement à des promoteurs naturels. Enfin, la protéine TSC-22 n'était pas détectable dans les cellules HL-60.

Nous avons surexprimé les protéines FOXO3 et TSC-22 dans les cellules HL-60, en transfectant transitoirement des plasmides identiques (pcDNA3), codant soit pour FOXO3, soit pour TSC-22. Cependant, nous avons observé une modification de l'expression de chacune des protéines lors de la co-transfection des plasmides. L'hypothèse émise était une titration des co-facteurs nécessaires à l'activité des promoteurs, qui étaient effectivement identiques. Nous avons donc construit de nouveaux plasmides codant pour FOXO3 ou TSC-22, constitués de promoteurs différents. Différents tests nous ont permis de mettre en évidence la combinaison de plasmides pour laquelle aucune modification de l'expression de FOXO3 et TSC-22 n'était observée. Dans ces conditions, nous avons montré que l'activité transcriptionnelle de FOXO3 induite dans les cellules HL-60 pouvait être inhibée par TSC-22, sans que son expression soit diminuée.

D'autre part, nous avons étudié la localisation de TSC-22 et FOXO3 au cours de la déprivation en IL-2.

Nos expériences d'immunofluorescence réalisées sur des cellules CTLL-2 surexprimant GFP-FOXO3 et DsRed-TSC-22 ont permis de montrer que TSC-22 et FOXO3, présentes dans le cytoplasme dans les cellules CTLL-2 en culture avec de l'IL-2, étaient localisées dans le noyau dans les cellules déprivées en IL-2. Nos observations démontrent donc que TSC-22 ne modifie pas la localisation subcellulaire de FOXO3 au cours de la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2.

La localisation de FOXO3 a été bien étudiée précédemment. Dans les cellules déprivées en facteurs de croissance, FOXO3 est décrite pour être localisée dans le noyau (Salih and Brunet 2008). Nous avons effectivement montré que dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2, FOXO3 était nucléaire (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous avons également montré précédemment que FOXO3 était nucléaire dans la lignée cellulaire HL-60, mais était relocalisée dans le cytoplasme en présence de GILZ (Latre de Late *et al.*, 2010).

Quant à TSC-22, sa localisation a été peu étudiée. La protéine de fusion GFP-TSC-22

est capable de migrer du cytoplasme vers le noyau dans les cellules TYS, suite au traitement par le 5-fluorouracile, une molécule pro-apoptotique (Hino *et al.*, 2000). Par ailleurs, une autre protéine de la famille TSC-22D, THG-1, qui possède une activité pro-apoptotique, a été décrite pour être localisée dans le noyau de cellules neuronales déprivées en facteur de croissance (Canterini *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que plusieurs protéines TSC-22D aux propriétés pro-apoptotiques ont la capacité de migrer dans le noyau. Aucun domaine NLS n'a été décrit pour ces protéines. Cependant, le domaine TSC-box a été montré comme pouvant jouer un rôle dans la localisation nucléaire de TSC-22 chez *Xenopus laevis* (Hashiguchi *et al.*, 2007). Nous pourrions supposer que ce domaine participe au mécanisme de relocalisation nucléaire de TSC-22 dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2.

Nos diverses expériences démontrent donc que TSC-22 pourrait inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXO3 dans les cellules HL-60 et que, dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2, TSC-22 est localisée dans le noyau. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la localisation nucléaire de TSC-22 au cours de la déprivation en IL-2 est nécessaire à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de FOXO3, induite par la déprivation en IL-2, et par conséquent, à la transcription de *gilz*.

L'absence de relocalisation cytoplasmique de FOXO3 par TSC-22 démontre que le mécanisme d'inhibition de l'activité de FOXO3 mis en place par TSC-22 est différent du mécanisme par lequel GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO3, décrit précédemment (Latre de Late *et al.*, 2010). TSC-22 a été décrit comme étant capable d'interagir avec le facteur de transcription TFE3 pour former un complexe qui se fixe sur le promoteur du gène *col1a2*, et qui induirait sa transcription (Kato *et al.*, 2010). Nous pourrions alors imaginer que TSC-22 puisse inhiber l'activité du facteur de transcription FOXO3 en interagissant physiquement avec lui.

4. TSC-22 interagit-il avec GILZ ?

Aucune étude n'a démontré jusqu'à présent une interaction entre TSC-22 et GILZ, bien que ces protéines présentent une forte homologie de séquence.

Nous avons donc déterminé si une telle interaction entre GILZ et TSC-22 pouvait exister.

Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées à partir de lysats totaux de cellules HL-60 dans lesquelles GILZ et TSC-22 étaient surexprimées, ont permis de montrer que GILZ et TSC-22 pouvaient interagir, dans les premières heures suivant leur expression. Nous pourrions donc nous demander si dans les clones CTLL-2 TSC-22, au cours de la déprivation en IL-2, la protéine GILZ endogène dont l'expression est induite par la déprivation en IL-2, peut interagir avec TSC-22.

Les domaines TSC-box et leucine zipper sont responsables de la dimérisation de TSC-22, THG-1, ainsi que de celle de GILZ (Kester *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2007). Selon l'étude de Di Marco *et al.*, la mutation des quatre leucines du domaine leucine zipper inhiberait totalement l'homodimérisation de GILZ (Di Marco *et al.*, 2007). Au sein du laboratoire, nous avons construit un plasmide codant pour la protéine GILZ mutée sur les quatre leucines. Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans les cellules HL-60 surexprimant GILZ et GILZ muté nous ont montré que l'interaction physique directe était toujours possible (résultat personnel, non montré). Ce qui suggère que le domaine LZ n'est pas le seul domaine impliqué dans la dimérisation de GILZ. Nous pouvons donc supposer que les domaines TSC-box et LZ participent tous les deux à l'interaction directe entre GILZ et TSC-22.

Il a en outre été décrit que la dimérisation de GILZ était nécessaire afin que GILZ puisse interagir avec NF-kB et inhiber son activité transcriptionnelle (Kester *et al.*, 1999; Di Marco *et al.*, 2007). Au contraire, la dimérisation de GILZ n'est pas requise pour qu'il inhibe l'activité d'AP-1 en interagissant *via* sa région riche en prolines (Mittelstadt and Ashwell 2001).

Par ailleurs, il a été démontré que l'hétéro-dimérisation de TSC-22 pouvait modifier son activité. Ainsi, dans les cellules HDF Tig3, la dimérisation de TSC-22 à THG-1 permet à TSC-22 d'être actif, et la surexpression de THG-1 augmente même l'effet anti-prolifératif de TSC-22 (Homig-Holzel *et al.*, 2011). Par ailleurs, dans les cellules COS-1, la dimérisation de TSC-22 et THG-1 est indispensable pour que TSC-22 exerce son activité transcriptionnelle répressive (Kester *et al.*, 1999). La dimérisation de TSC-22 régule donc ici son activité positivement.

Au contraire, l'interaction entre TSC-22 et une autre protéine, la Fortiline, serait responsable d'une diminution de son activité, car l'interaction avec la Fortiline conduit à la

dégradation de la protéine TSC-22 (Lee *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant de déterminer si l'interaction entre GILZ et TSC-22 observée dans les cellules HL-60 peut conduire à la dégradation de GILZ ou de TSC-22, ou si au contraire, cette interaction permet d'augmenter l'activité d'une des deux protéines.

5. GILZ régule la localisation de FOXO3 et donc son activité transcriptionnelle.

Suite au travail effectué lors de la thèse de Marie-Liesse Asselin-Labat, un nouveau projet de recherche avait été débuté, consistant en la thèse de Perlé Latré de Laté, soutenue en janvier 2010. J'ai participé à ce projet de recherche dont le thème était l'étude du mécanisme moléculaire de l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription FOXO3 par la protéine GILZ.

Il a tout d'abord été démontré que GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle des différents facteurs de transcription FOXO1, FOXO3 et FOXO4. Ces tests ont été effectués dans les cellules HL-60, cellules dans lesquelles les facteurs FOXO ne sont pas détectables par Western-Blot, et indépendantes de toute cytokine pour leur survie, contrairement aux cellules CTLL-2. Différents plasmides rapporteurs ont été utilisés : des plasmides contenant des promoteurs naturels des gènes cibles de FOXO3 et FOXO4, tels que ceux de *bim*, *fasl*, et *p27*, et un plasmide contenant un promoteur synthétique composé de trois séquences IRS sur lesquelles les facteurs FOXO se fixent. L'avantage de ce dernier plasmide est de n'être régulé que par les FOXO, et non par les autres facteurs de transcription pouvant se fixer sur les promoteurs naturels ; par conséquent, nous ne mesurons que l'activité des facteurs FOXO et aucun bruit de fond n'est détecté.

Afin de déterminer si GILZ pouvait réguler l'activité de FOXO3 via des kinases bien connues pour phosphoryler FOXO3, des mutants de FOXO3 ont été générés : FOXO3 TM est un mutant non phosphorylable par Akt/PKB sur les trois sites décrits (thréonine 32, serine 253, et sérine 315 pour FOXO3), les mutants de la sérine 644 (FOXO3-WT-S644A et FOXO3-TM-S644A) non phosphorylables par IKK (figure 36). L'activité transcriptionnelle induite par ces mutants est toujours inhibée par GILZ, ce qui suggère que GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO3 indépendamment de ces kinases.

L'étude, par des expériences d'immunofluorescence, de la localisation nucléocytoplasmique des protéines FOXO3 et GILZ, a permis de montrer que FOXO3 WT et FOXO3 TM, nucléaires, étaient relocalisés dans le cytoplasme en présence de GILZ. De plus, nous avons montré que GILZ doit être localisé dans le cytoplasme, afin qu'il exerce son activité inhibitrice. En effet, l'ajout d'un domaine NLS (Nuclear Localisation Signal) en position N-terminale de GILZ le relocalise majoritairement dans le noyau et l'empêche d'inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXO3.

Le mécanisme par lequel GILZ relocalise FOXO3 dans le cytoplasme a été ensuite approfondi. D'une part, nous avons montré que, bien que GILZ et FOXO3 étaient tous deux localisés dans le cytoplasme, ils n'interagissaient pas physiquement. D'autre part, nous avons montré que la séquence NES de FOXO3 était indispensable à sa relocalisation cytoplasmique induite par GILZ, et que l'inhibition de l'export nucléaire de FOXO3 par la leptomycine B, un inhibiteur de Crm1, induisait son import nucléaire. Ces résultats suggèrent ainsi que GILZ modifie l'export de FOXO3 en modifiant les interactions Crm1-NES. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que GILZ modifie l'activité de kinases régulant la phosphorylation de FOXO3 et ses possibles interactions avec les molécules Crm1.

L'originalité de ce travail a été de démontrer que GILZ, localisée dans le cytoplasme, était capable de réguler l'activité transcriptionnelle de FOXO3 en modifiant sa localisation cellulaire, sans interagir directement avec ce facteur, mais en régulant les mécanismes impliqués dans son export nucléaire. Depuis cette publication, des travaux ont montré que GILZ pouvait inhiber l'activité d'un autre facteur de transcription, MyoD, dans la lignée cellulaire myoblastique C2C12 (Bruscoli *et al.*, 2010). GILZ, ainsi que l'isoforme L-GILZ, seraient capables d'interagir directement avec MyoD, ainsi qu'avec l'histone déacétylase HDAC1, pour inhiber l'activité transcriptionnelle de MyoD (Bruscoli *et al.*, 2010). Le mécanisme décrit ici est différent de celui que nous avons démontré précédemment, suggérant la diversité des mécanismes régulés par GILZ.

II. Perspectives : Fonctions des protéines TSC-22D lors de l'homéostasie lymphocytaire.

Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes T vont proliférer et se différencier puis lors de la phase de contraction de la réponse, ils vont rentrer en apoptose, notamment à cause du manque de facteurs de croissance dans l'environnement (Schluns and Lefrancois 2003). Au contraire, certaines cellules vont continuer à survivre et participer à la génération de LT mémoires (Schluns and Lefrancois 2003).

La déprivation en cytokines a été décrite récemment comme étant induite par les LT régulateurs, caractérisés par l'expression de CD4, CD25 et FOXP3, et étant responsable de l'apoptose de LT effecteurs CD4⁺ (Pandiyan *et al.*, 2007). Les cocultures *in vitro* de LT régulateurs et de LT effecteurs ont permis de montrer que les LT régulateurs étaient capables de consommer l'IL-2 présent dans le milieu de culture. De plus, l'ajout de cytokines telles que l'IL-7, l'IL-15, et l'IL-21, dont les récepteurs sont composés de la chaîne γ commune, permet de diminuer l'apoptose induite par les LT régulateurs. Enfin, des cocultures réalisées avec des LT effecteurs issus de souris déficientes en BIM, ont montré que ces LT sont résistants à la déprivation en cytokines, démontrant ainsi que l'apoptose induite par les LT régulateurs implique la protéine BIM (Pandiyan *et al.*, 2007).

Les lymphocytes T régulateurs sont des cellules qui produisent du TGF- β et de l'IL-10 (Letourneau *et al.*, 2009). Ces deux cytokines, aux propriétés anti-inflammatoires, participent à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ activés en différentes sous-populations de lymphocytes T helper et de lymphocytes T régulateurs, mais également à la génération de lymphocytes T mémoires (Sabat *et al.*, 2011; Yoshimura *et al.*, 2011).

L'interleukine-10 (IL-10) et le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ont été décrits comme des régulateurs positifs de l'expression de GILZ dans les macrophages ou les cellules dendritiques (Berrebi *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2006). Le TGF- β est également capable d'induire l'expression de TSC-22 dans la lignée ostéoblastique MC3 T3 E1 (Shibanuma *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'expression de GILZ dans les cellules CTLL-2 peut aussi être régulée positivement par la déprivation en IL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004; Asselin-Labat *et al.*, 2005), ce qui n'est pas le cas pour TSC-22. Nous n'avons effectivement pas observé l'induction de l'ARNm de *tsc-22* dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2 (résultat personnel, non montré).

Nous avons montré précédemment que GILZ et TSC-22 régulaient l'apoptose induite par la déprivation en IL-2 d'une lignée de lymphocytes T cytotoxiques, les cellules CTLL-2. TSC-22 augmente l'apoptose en régulant négativement l'expression de la protéine anti-apoptotique GILZ et en induisant l'expression de BIM.

L'hypothèse proposée est la suivante. L'expression de GILZ et TSC-22 peut être régulée dans les lymphocytes T, en partie par des cytokines, telles que le TGF- β ou l'IL-10, et l'expression des protéines de la famille TSC-22D participe à la régulation de l'homéostasie lymphocytaire T, en favorisant la survie ou l'apoptose de certaines sous-populations de LT.

Les protéines GILZ et TSC-22 ont toutes deux été décrites comme inhibiteurs de la prolifération des cellules hématopoïétiques (Ayroldi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). De plus, nous avons montré que GILZ régule négativement l'apoptose des LT, et que TSC-22 augmente l'apoptose induite par la déprivation en IL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous pourrions donc supposer que GILZ est plutôt exprimé dans les LT ayant une durée de vie longue et proliférant peu, tels que les LT mémoires, et que TSC-22 est présent dans les LT présentant une durée de vie plus courte.

Il faudrait donc déterminer si ces protéines de la famille TSC-22D peuvent être exprimées dans les LT et dans quelles sous-populations de LT (LT effecteurs, LT mémoires, LT régulateurs). Nous avons montré précédemment que les ARNm à la fois de *gilz* et de *tsc-22* étaient exprimés dans les lymphocytes T humains, issus de sang périphérique, et dans les lymphocytes T murins, purifiés à partir de la rate de souris. Leur expression était également détectée dans les sous-populations de LT CD4⁺ humaines et murines (résultat personnel, non montré).

L'IL-10 est capable d'inhiber la prolifération des LT CD4⁺ et l'expression de cytokines telles que l'IL-2 (Sabat *et al.*, 2011). Nous pourrions donc supposer que GILZ est plus exprimé dans les LT répondant à l'IL-10.

Les LT régulateurs étant différenciés principalement grâce au TGF- β et à l'IL-10 (Sabat *et al.*, 2011), nous pourrions imaginer que GILZ est également fortement exprimée dans ces cellules. Cependant la chaîne α du récepteur de l'IL-2, IL-2R α ou CD25, est fortement exprimée sur ces cellules (Sabat *et al.*, 2011). L'expression de GILZ étant inhibée par l'IL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2005), nous pourrions penser que son expression est en fait très faible dans les LT régulateurs.

Le TGF- β étant capable d'induire l'apoptose des LT en inhibant l'expression de l'IL-2

(Yoshimura *et al.*, 2011), nous pourrions aussi supposer que TSC-22 est exprimé dans les cellules exprimant le récepteur du TGF- β .

L'identification des stimuli de l'induction de GILZ et TSC-22 permettra ensuite de définir si ces protéines régulent ou non l'apoptose des LT activés et déprivés en IL-2.

La dimérisation des protéines de la famille TSC-22D a été décrite dans divers types cellulaires, et participerait à la régulation de la fonction de ces cellules. Ainsi, la dimérisation entre TSC-22 et THG-1 permet à TSC-22 d'induire la sénescence des cellules HDF Tig3 (Homig-Holzel *et al.*, 2011). D'autre part, la dimérisation de GILZ est requise pour qu'il inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Di Marco *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'interaction entre TSC-22 et la protéine Fortiline permet de réguler l'expression et donc l'activité pro-apoptotique de TSC-22 (Lee *et al.*, 2008).

Il serait donc intéressant d'évaluer si, dans les différentes sous-populations de LT exprimant GILZ ou TSC-22, ces protéines peuvent interagir et si cette interaction permet de réguler l'activité de ces protéines. Nous pourrions également supposer que TSC-22 et/ou GILZ interagissent avec THG-1, une autre protéine de la famille TSC-22D, et que cette dernière stabilise l'expression de GILZ ou TSC-22.

Les hypothèses proposées sont schématisées dans la figure suivante (figure 46).

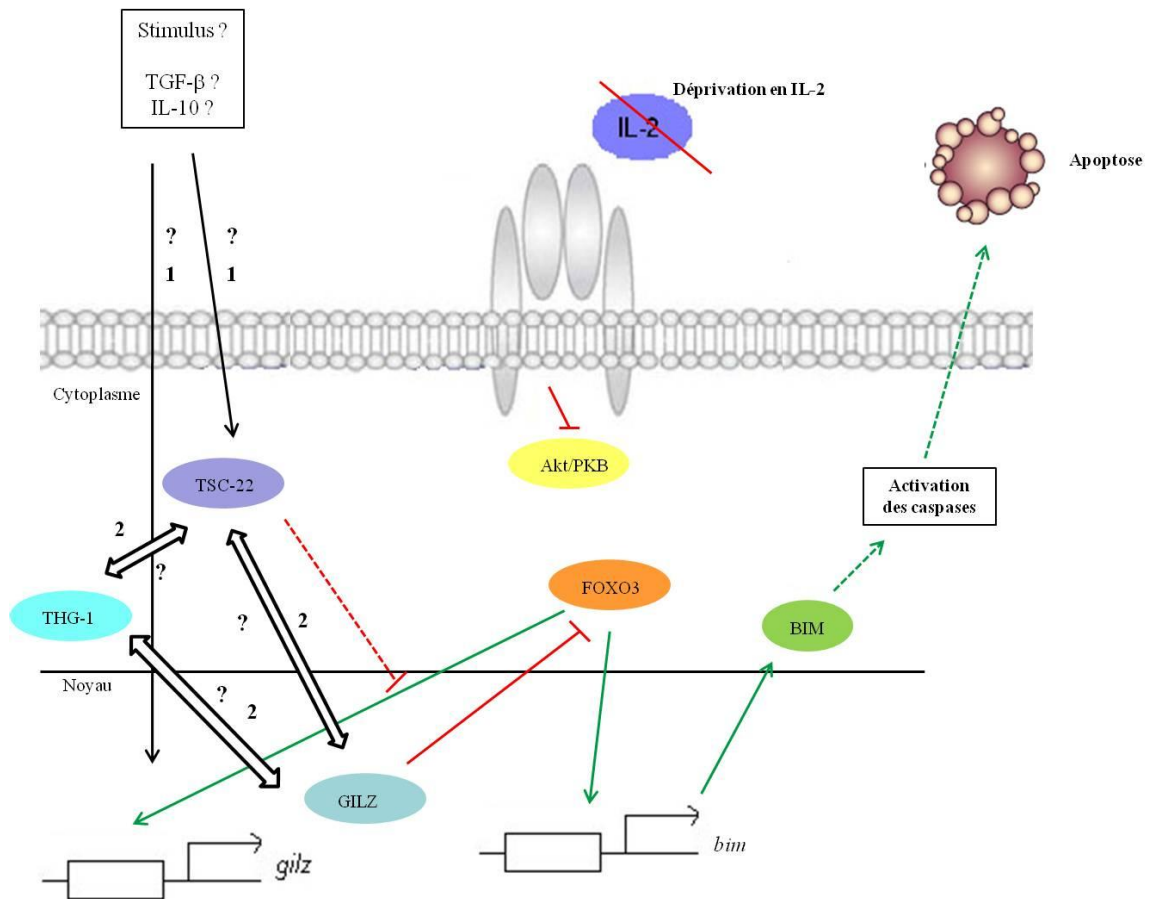


Figure 46. Schéma récapitulatif des hypothèses proposées à propos des mécanismes régulant l'expression de GILZ et TSC-22 et leur interaction au cours de l'apoptose de lymphocytes T déprivés en IL-2. Les flèches vertes correspondent à une activation, les flèches rouges à une inhibition et les flèches noires correspondent aux hypothèses. Les flèches pleines représentent un mécanisme direct et les flèches en pointillés un mécanisme indirect. (1) Les cytokines TGF- β et IL-10 induisent-elles l'expression des protéines TSC-22 et GILZ dans les lymphocytes T ? (2) Existe-t-il une interaction entre les protéines de la famille TSC-22D ?

III. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons donc montré que TSC-22 était une molécule ayant une activité pro-apoptotique lorsqu'elle était surexprimée dans la lignée de lymphocytes T murins cytotoxiques déprivée en IL-2, les CTLL-2. En effet, TSC-22 est capable de réguler positivement l'expression de BIM, résultant en une activation accrue des caspases. GILZ, une autre protéine de la famille TSC-22, est connue pour inhiber l'expression de BIM et retarder l'entrée en apoptose des CTLL-2 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Nous avons montré ici que

l'induction de GILZ au cours de la déprivation en IL-2 était fortement diminuée par TSC-22. La régulation négative de l'expression de la protéine GILZ est due à une régulation négative de l'expression de l'ARNm de *gilz*.

L'étude du mécanisme par lequel TSC-22 régule l'expression de GILZ a ensuite été débutée. La transcription de *gilz* étant régulée par le facteur de transcription FOXO3 dans les cellules déprivées en IL-2, nous avons analysé l'effet de TSC-22 sur l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Nous avons montré que TSC-22 inhibait l'activité transcriptionnelle de FOXO3 dans les cellules HL-60 surexprimant TSC-22 et FOXO3. Nous avons ensuite analysé la localisation subcellulaire de FOXO3 et TSC-22 et montré que FOXO3 et TSC-22, présentes dans le cytoplasme des cellules CTLL-2 en culture avec de l'IL-2, migraient dans le noyau des cellules déprivées en IL-2. Ces résultats suggèrent que TSC-22 régule l'activité transcriptionnelle de FOXO3, et nous pouvons supposer que cette régulation est responsable de la régulation de l'expression de GILZ.

GILZ avait été décrit précédemment comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de FOXO3 (Asselin-Labat *et al.*, 2004). Au cours de ma thèse, j'ai collaboré au projet de recherche de Perle Latré de Laté, consistant à déterminer le mécanisme par lequel GILZ inhibe l'activité transcriptionnelle de FOXO3. Nous avons montré que GILZ inhibait l'activité de FOXO3 en le relocalisant dans le cytoplasme, en régulant un mécanisme impliquant le système de transport Crm1.

Les perspectives de ce travail se divisent principalement en deux parties.

D'une part, le mécanisme par lequel TSC-22 régule l'expression de GILZ mérite d'être approfondi. L'hypothèse actuelle est que TSC-22 inhiberait la transcription de *gilz*, indirectement en régulant l'activité transcriptionnelle de FOXO3.

D'autre part, l'étude des rôles respectifs de TSC-22 et GILZ dans l'homéostasie lymphocytaire T devrait être réalisée. Le(s) stimulus(i) de l'expression commune de GILZ et TSC-22 devrait(ent) être identifié(s) afin de caractériser les sous-populations lymphocytaires T dans lesquelles ces protéines sont exprimées, et de définir si GILZ et TSC-22 participent à la régulation de l'apoptose de certaines sous-populations de lymphocytes T en fin de réponse immunitaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abutin, R. M., J. Chen, T. K. Lung, J. A. Lloyd, S. T. Sawyer and H. Harada (2009). "Erythropoietin-induced phosphorylation/degradation of BIM contributes to survival of erythroid cells." Exp Hematol **37**(2): 151-8.
- Adachi, M., X. Zhao and K. Imai (2005). "Nomenclature of dynein light chain-linked BH3-only protein Bim isoforms." Cell Death Differ **12**(2): 192-3.
- Adams, A. B., M. A. Williams, T. R. Jones, N. Shirasugi, M. M. Durham, S. M. Kaech, E. J. Wherry, T. Onami, J. G. Lanier, K. E. Kokko, T. C. Pearson, R. Ahmed and C. P. Larsen (2003). "Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance." J Clin Invest **111**(12): 1887-95.
- Altieri, D. C. (2010). "Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms." Biochem J **430**(2): 199-205.
- Ash, D. M., J. F. Hackney, M. Jean-Francois, N. C. Burton and L. L. Dobens (2007). "A dominant negative allele of the Drosophila leucine zipper protein Bunched blocks bunched function during tissue patterning." Mech Dev **124**(7-8): 559-69.
- Asselin-Labat, M. L., A. Biola-Vidamment, S. Kerbrat, M. Lombes, J. Bertoglio and M. Pallardy (2005). "FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression." Mol Endocrinol **19**(7): 1752-64.
- Asselin-Labat, M. L., M. David, A. Biola-Vidamment, D. Lecoecue, M. C. Zennaro, J. Bertoglio and M. Pallardy (2004). "GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis." Blood **104**(1): 215-23.
- Ayroldi, E., G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamio and C. Riccardi (2001). "Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB." Blood **98**(3): 743-53.
- Ayroldi, E. and C. Riccardi (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action." FASEB J **23**(11): 3649-58.
- Ayroldi, E., O. Zollo, A. Bastianelli, C. Marchetti, M. Agostini, R. Di Virgilio and C. Riccardi (2007). "GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling." J Clin Invest **117**(6): 1605-15.
- Ayroldi, E., O. Zollo, A. Macchiarulo, B. Di Marco, C. Marchetti and C. Riccardi (2002). "Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1." Mol Cell Biol **22**(22): 7929-41.
- Beaulieu, E. and E. F. Morand (2011). "Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol.
- Beaulieu, E. and E. F. Morand (2011). "Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol **7**(6): 340-8.
- Berrebi, D., S. Bruscoli, N. Cohen, A. Foussat, G. Migliorati, L. Bouchet-Delbos, M. C. Maillot, A. Portier, J. Couderc, P. Galanaud, M. Peuchmaur, C. Riccardi and D. Emilie (2003). "Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10." Blood **101**(2): 729-38.
- Biswas, S. C. and L. A. Greene (2002). "Nerve growth factor (NGF) down-regulates the Bcl-2 homology 3 (BH3) domain-only protein Bim and suppresses its proapoptotic activity by phosphorylation." J Biol Chem **277**(51): 49511-6.
- Bjorgo, E. and K. Tasken (2010). "Novel mechanism of signaling by CD28." Immunol Lett **129**(1): 1-6.
- Bosque, A., I. Marzo, J. Naval and A. Anel (2007). "Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8+ T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss." Mol Immunol **44**(6): 1446-53.
- Bouillet, P. and L. A. O'Reilly (2009). "CD95, BIM and T cell homeostasis." Nat Rev Immunol **9**(7): 514-9.
- Bouillet, P., L. C. Zhang, D. C. Huang, G. C. Webb, C. D. Bottema, P. Shore, H. J. Eyre, G. R. Sutherland and J. M. Adams (2001). "Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim." Mamm Genome **12**(2): 163-8.

- Boyman, O., S. Letourneau, C. Krieg and J. Sprent (2009). "Homeostatic proliferation and survival of naive and memory T cells." *Eur J Immunol* **39**(8): 2088-94.
- Brenkman, A. B., P. L. de Keizer, N. J. van den Broek, A. G. Jochemsen and B. M. Burgering (2008). "Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4." *PLoS One* **3**(7): e2819.
- Brenner, D., P. H. Krammer and R. Arnold (2008). "Concepts of activated T cell death." *Crit Rev Oncol Hematol* **66**(1): 52-64.
- Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmond, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *Cell* **96**(6): 857-68.
- Brunet, A., L. B. Sweeney, J. F. Sturgill, K. F. Chua, P. L. Greer, Y. Lin, H. Tran, S. E. Ross, R. Mostoslavsky, H. Y. Cohen, L. S. Hu, H. L. Cheng, M. P. Jedrychowski, S. P. Gygi, D. A. Sinclair, F. W. Alt and M. E. Greenberg (2004). "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase." *Science* **303**(5666): 2011-5.
- Bruscoli, S., V. Donato, E. Velardi, M. Di Sante, G. Migliorati, R. Donato and C. Riccardi (2010). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids." *J Biol Chem* **285**(14): 10385-96.
- Burgering, B. M. (2008). "A brief introduction to FOXology." *Oncogene* **27**(16): 2258-62.
- Cai, B., S. H. Chang, E. B. Becker, A. Bonni and Z. Xia (2006). "p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65." *J Biol Chem* **281**(35): 25215-22.
- Cannarile, L., S. Cuzzocrea, L. Santucci, M. Agostini, E. Mazzon, E. Esposito, C. Muia, M. Coppo, R. Di Paola and C. Riccardi (2009). "Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis." *Gastroenterology* **136**(2): 530-41.
- Cannarile, L., F. Fallarino, M. Agostini, S. Cuzzocrea, E. Mazzon, C. Vacca, T. Genovese, G. Migliorati, E. Ayroldi and C. Riccardi (2006). "Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines." *Blood* **107**(3): 1039-47.
- Cannarile, L., O. Zollo, F. D'Adamio, E. Ayroldi, C. Marchetti, A. Tabilio, S. Bruscoli and C. Riccardi (2001). "Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene." *Cell Death Differ* **8**(2): 201-3.
- Canterini, S., A. Bosco, V. De Matteis, F. Mangia and M. T. Fiorenza (2009). "THG-1pit moves to nucleus at the onset of cerebellar granule neurons apoptosis." *Mol Cell Neurosci* **40**(2): 249-57.
- Canterini, S., F. Mangia and M. T. Fiorenza (2005). "Thg-1 pit gene expression in granule cells of the developing mouse brain and in their synaptic targets, mature Purkinje, and mitral cells." *Dev Dyn* **234**(3): 689-97.
- Chandok, M. R. and D. L. Farber (2004). "Signaling control of memory T cell generation and function." *Semin Immunol* **16**(5): 285-93.
- Cho, J. W., C. W. Kim and K. S. Lee (2007). "Modification of gene expression by melatonin in UVB-irradiated HaCaT keratinocyte cell lines using a cDNA microarray." *Oncol Rep* **17**(3): 573-7.
- Cohen, N., E. Mouly, H. Hamdi, M. C. Maillot, M. Pallardy, V. Godot, F. Capel, A. Balian, S. Naveau, P. Galanaud, F. M. Lemoine and D. Emilie (2006). "GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response." *Blood* **107**(5): 2037-44.
- Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Van Loo, X. Saelens, P. Vandenabeele and R. Beyaert (2005). "Apoptosis of hematopoietic cells induced by growth factor withdrawal is associated with caspase-9 mediated cleavage of Raf-1." *Oncogene* **24**(9): 1552-62.
- Czymai, T., D. Viemann, C. Sticht, G. Molema, M. Goebeler and M. Schmidt (2010). "FOXO3 modulates endothelial gene expression and function by classical and alternative mechanisms." *J Biol Chem* **285**(14): 10163-78.
- D'Adamio, F., O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati and C. Riccardi (1997). "A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death." *Immunity* **7**(6): 803-12.
- Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Aratani, T. Ohshima, M. Miyagishi, T. Nakajima and A.

- Fukamizu (2004). "Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(27): 10042-7.
- Daugas, E., D. Nochy, L. Ravagnan, M. Loeffler, S. A. Susin, N. Zamzami and G. Kroemer (2000). "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." FEBS Lett **476**(3): 118-23.
- Delfino, D. V., M. Agostini, S. Spinicelli, P. Vito and C. Riccardi (2004). "Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice." Blood **104**(13): 4134-41.
- Delfino, D. V., S. Spinicelli, N. Pozzese, S. Pierangeli, E. Velardi, S. Bruscoli, M. P. Martelli, V. Pettitrossi, L. Falchi, T. B. Kang and C. Riccardi (2010). "Glucocorticoid-induced activation of caspase-8 protects the glucocorticoid-induced protein Gilz from proteasomal degradation and induces its binding to SUMO-1 in murine thymocytes." Cell Death Differ.
- Dewson, G., T. Kratina, H. W. Sim, H. Puthalakath, J. M. Adams, P. M. Colman and R. M. Kluck (2008). "To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions." Mol Cell **30**(3): 369-80.
- Di Marco, B., M. Massetti, S. Bruscoli, A. Macchiarulo, R. Di Virgilio, E. Velardi, V. Donato, G. Migliorati and C. Riccardi (2007). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain." Nucleic Acids Res **35**(2): 517-28.
- Dijkers, P. F., K. U. Birkenkamp, E. W. Lam, N. S. Thomas, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffe (2002). "FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity." J Cell Biol **156**(3): 531-42.
- Dijkers, P. F., R. H. Medema, J. W. Lammers, L. Koenderman and P. J. Coffe (2000). "Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1." Curr Biol **10**(19): 1201-4.
- Dobens, L. L., T. Hsu, V. Twombly, W. M. Gelbart, L. A. Raftery and F. C. Kafatos (1997). "The Drosophila bunched gene is a homologue of the growth factor stimulated mammalian TSC-22 sequence and is required during oogenesis." Mech Dev **65**(1-2): 197-208.
- Dohrmann, C. E., M. Belaoussoff and L. A. Raftery (1999). "Dynamic expression of TSC-22 at sites of epithelial-mesenchymal interactions during mouse development." Mech Dev **84**(1-2): 147-51.
- Eddleston, J., J. Herschbach, A. L. Wagelie-Steffen, S. C. Christiansen and B. L. Zuraw (2007). "The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells." J Allergy Clin Immunol **119**(1): 115-22.
- Erlacher, M., V. Labi, C. Manzl, G. Bock, A. Tzankov, G. Hacker, E. Michalak, A. Strasser and A. Villunger (2006). "Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction." J Exp Med **203**(13): 2939-51.
- Essafi, M., A. D. Baudot, X. Mouska, J. P. Cassuto, M. Ticchioni and M. Deckert (2011). "Cell-penetrating TAT-FOXO3 fusion proteins induce apoptotic cell death in leukemic cells." Mol Cancer Ther **10**(1): 37-46.
- Fiol, D. F. and D. Kultz (2005). "Rapid hyperosmotic coinduction of two tilapia (*Oreochromis mossambicus*) transcription factors in gill cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 927-32.
- Fiol, D. F., S. K. Mak and D. Kultz (2007). "Specific TSC22 domain transcripts are hypertonically induced and alternatively spliced to protect mouse kidney cells during osmotic stress." FEBS J **274**(1): 109-24.
- Fiorenza, M. T., M. Mukhopadhyay and H. Westphal (2001). "Expression screening for Lhx3 downstream genes identifies Thg-1pit as a novel mouse gene involved in pituitary development." Gene **278**(1-2): 125-30.
- Friedl, P., A. T. den Boer and M. Gunzer (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-45.
- Fu, Z. and D. J. Tindall (2008). "FOXOs, cancer and regulation of apoptosis." Oncogene **27**(16):

- Giam, M., D. C. Huang and P. Bouillet (2008). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." *Oncogene* **27** *Suppl 1*: S128-36.
- Gilley, J., P. J. Coffey and J. Ham (2003). "FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons." *J Cell Biol* **162**(4): 613-22.
- Gluderer, S., S. Oldham, F. Rintelen, A. Sulzer, C. Schutt, X. Wu, L. A. Raftery, E. Hafen and H. Stocker (2008). "Bunched, the Drosophila homolog of the mammalian tumor suppressor TSC-22, promotes cellular growth." *BMC Dev Biol* **8**: 10.
- Godot, V., G. Garcia, F. Capel, M. Arock, I. Durand-Gasselien, M. L. Asselin-Labat, D. Emilie and M. Humbert (2006). "Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells." *Allergy* **61**(7): 886-90.
- Greer, E. L., P. R. Oskoui, M. R. Banko, J. M. Maniar, M. P. Gygi, S. P. Gygi and A. Brunet (2007). "The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor." *J Biol Chem* **282**(41): 30107-19.
- Gupta, R. A., P. Sarraf, J. A. Brockman, S. B. Shappell, L. A. Raftery, T. M. Willson and R. N. DuBois (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22." *J Biol Chem* **278**(9): 7431-8.
- Gupta, V., N. Awasthi and B. J. Wagner (2007). "Specific activation of the glucocorticoid receptor and modulation of signal transduction pathways in human lens epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(4): 1724-34.
- Hamadeh, H. K., P. R. Bushel, S. Jayadev, K. Martin, O. DiSorbo, S. Sieber, L. Bennett, R. Tennant, R. Stoll, J. C. Barrett, K. Blanchard, R. S. Paules and C. A. Afshari (2002). "Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles." *Toxicol Sci* **67**(2): 219-31.
- Hamdi, H., A. Bigorgne, S. Naveau, A. Balian, L. Bouchet-Delbos, A. M. Cassard-Doulcier, M. C. Maillot, I. Durand-Gasselien, S. Prevot, J. Delaveaucoupet, D. Emilie and G. Perlemuter (2007). "Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis." *Hepatology* **46**(6): 1986-92.
- Hamdi, H., V. Godot, M. C. Maillot, M. V. Prejean, N. Cohen, R. Krzysiek, F. M. Lemoine, W. Zou and D. Emilie (2007). "Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper." *Blood* **110**(1): 211-9.
- Hamil, K. G. and S. H. Hall (1994). "Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: regulation of TSC-22 gene expression." *Endocrinology* **134**(3): 1205-12.
- Harada, H., B. Quearry, A. Ruiz-Vela and S. J. Korsmeyer (2004). "Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(43): 15313-7.
- Hashiguchi, A., K. Hitachi, M. Inui, K. Okabayashi and M. Asashima (2007). "TSC-box is essential for the nuclear localization and antiproliferative effect of XTSC-22." *Dev Growth Differ* **49**(3): 197-204.
- Hashiguchi, A., K. Okabayashi and M. Asashima (2004). "Role of TSC-22 during early embryogenesis in *Xenopus laevis*." *Dev Growth Differ* **46**(6): 535-44.
- Hebert, M., S. Potin, M. Sebbagh, J. Bertoglio, J. Breard and J. Hamelin (2008). "Rho-ROCK-dependent ezrin-radixin-moesin phosphorylation regulates Fas-mediated apoptosis in Jurkat cells." *J Immunol* **181**(9): 5963-73.
- Herold, M. J., K. G. McPherson and H. M. Reichardt (2006). "Glucocorticoids in T cell apoptosis and function." *Cell Mol Life Sci* **63**(1): 60-72.
- Hino, S., H. Kawamata, F. Omotehara, D. Uchida, Y. Miwa, N. M. Begum, H. Yoshida, M. Sato and T. Fujimori (2002). "Cytoplasmic TSC-22 (transforming growth factor-beta-stimulated clone-22) markedly enhances the radiation sensitivity of salivary gland cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 957-63.
- Hino, S., H. Kawamata, D. Uchida, F. Omotehara, Y. Miwa, N. M. Begum, H. Yoshida, T. Fujimori and M. Sato (2000). "Nuclear translocation of TSC-22 (TGF-beta-stimulated clone-22)

- concomitant with apoptosis: TSC-22 as a putative transcriptional regulator." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 659-64.
- Homig-Holzel, C., R. van Doorn, C. Vogel, M. Germann, M. G. Cecchini, E. Verdegaal and D. S. Peeper (2011). "Antagonistic TSC22D1 variants control BRAF(E600)-induced senescence." Embo J **30**(9): 1753-65.
- Hu, M. C., D. F. Lee, W. Xia, L. S. Golfman, F. Ou-Yang, J. Y. Yang, Y. Zou, S. Bao, N. Hanada, H. Saso, R. Kobayashi and M. C. Hung (2004). "IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." Cell **117**(2): 225-37.
- Huang, H., K. M. Regan, F. Wang, D. Wang, D. I. Smith, J. M. van Deursen and D. J. Tindall (2005). "Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1649-54.
- Huang, H. and D. J. Tindall (2011). "Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation." Biochim Biophys Acta.
- Iida, M., C. H. Anna, N. D. Gaskin, N. J. Walker and T. R. Devereux (2007). "The putative tumor suppressor Tsc-22 is downregulated early in chemically induced hepatocarcinogenesis and may be a suppressor of Gadd45b." Toxicol Sci **99**(1): 43-50.
- Iida, M., C. H. Anna, W. M. Holliday, J. B. Collins, M. L. Cunningham, R. C. Sills and T. R. Devereux (2005). "Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens." Carcinogenesis **26**(3): 689-99.
- Jang, S. W., S. J. Yang, S. Srinivasan and K. Ye (2007). "Akt phosphorylates MstI and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation." J Biol Chem **282**(42): 30836-44.
- Jay, P., J. W. Ji, C. Marsollier, S. Taviaux, J. L. Berge-Lefranc and P. Berta (1996). "Cloning of the human homologue of the TGF beta-stimulated clone 22 gene." Biochem Biophys Res Commun **222**(3): 821-6.
- Kaech, S. M., J. T. Tan, E. J. Wherry, B. T. Konieczny, C. D. Surh and R. Ahmed (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." Nat Immunol **4**(12): 1191-8.
- Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." Genes Dev **14**(2): 142-6.
- Kaminski, M., M. Kiessling, D. Suss, P. H. Krammer and K. Gulow (2007). "Novel role for mitochondria: protein kinase C theta-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death." Mol Cell Biol **27**(10): 3625-39.
- Kato, M., L. Wang, S. Putta, M. Wang, H. Yuan, G. Sun, L. Lanting, I. Todorov, J. J. Rossi and R. Natarajan (2010). "Posttranscriptional upregulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF-beta-induced collagen expression in kidney cells." J Biol Chem.
- Kawamata, H., K. Nakashiro, D. Uchida, S. Hino, F. Omotehara, H. Yoshida and M. Sato (1998). "Induction of TSC-22 by treatment with a new anti-cancer drug, vesnarinone, in a human salivary gland cancer cell." Br J Cancer **77**(1): 71-8.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce and J. J. Peschon (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." J Exp Med **191**(5): 771-80.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kester, H. A., C. Blanchetot, J. den Hertog, P. T. van der Saag and B. van der Burg (1999). "Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity." J Biol Chem **274**(39): 27439-47.
- Kester, H. A., B. M. van der Leede, P. T. van der Saag and B. van der Burg (1997). "Novel progesterone target genes identified by an improved differential display technique suggest that progestin-induced growth inhibition of breast cancer cells coincides with enhancement of differentiation." J Biol Chem **272**(26): 16637-43.

- Kester, H. A., T. M. Ward-van Oostwaard, M. J. Goumans, M. A. van Rooijen, P. T. van Der Saag, B. van Der Burg and C. L. Mummery (2000). "Expression of TGF-beta stimulated clone-22 (TSC-22) in mouse development and TGF-beta signalling." *Dev Dyn* **218**(4): 563-72.
- Khoury, C. M., Z. Yang, X. Y. Li, M. Vignali, S. Fields and M. T. Greenwood (2008). "A TSC22-like motif defines a novel antiapoptotic protein family." *FEMS Yeast Res* **8**(4): 540-63.
- Koike, M., T. Shiomi and A. Koike (2005). "Identification of Skin injury-related genes induced by ionizing radiation in human keratinocytes using cDNA microarray." *J Radiat Res (Tokyo)* **46**(2): 173-84.
- Kolbus, A., M. Blazquez-Domingo, S. Carotta, W. Bakker, S. Luedemann, M. von Lindern, P. Steinlein and H. Beug (2003). "Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling." *Blood* **102**(9): 3136-46.
- Kondrack, R. M., J. Harbertson, J. T. Tan, M. E. McBreen, C. D. Surh and L. M. Bradley (2003). "Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells." *J Exp Med* **198**(12): 1797-806.
- Krammer, P. H., R. Arnold and I. N. Lavrik (2007). "Life and death in peripheral T cells." *Nat Rev Immunol* **7**(7): 532-42.
- Latre de Late, P., A. Pepin, H. Assaf-Vandecasteele, C. Espinasse, V. Nicolas, M. L. Asselin-Labat, J. Bertoglio, M. Pallardy and A. Biola-Vidamment (2010). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) promotes the nuclear exclusion of FOXO3 in a Crm1-dependent manner." *J Biol Chem* **285**(8): 5594-605.
- Lee, J. H., S. B. Rho, S. Y. Park and T. Chun (2008). "Interaction between fortilin and transforming growth factor-beta stimulated clone-22 (TSC-22) prevents apoptosis via the destabilization of TSC-22." *FEBS Lett* **582**(8): 1210-8.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2432-7.
- Letourneau, S., C. Kriegl, G. Pantaleo and O. Boyman (2009). "IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets." *J Allergy Clin Immunol* **123**(4): 758-62.
- Ley, R., K. Balmanno, K. Hadfield, C. Weston and S. J. Cook (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim." *J Biol Chem* **278**(21): 18811-6.
- Ley, R., K. E. Ewings, K. Hadfield, E. Howes, K. Balmanno and S. J. Cook (2004). "Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover." *J Biol Chem* **279**(10): 8837-47.
- Li, W. Q., T. Guszczynski, J. A. Hixon and S. K. Durum (2010). "Interleukin-7 regulates Bim proapoptotic activity in peripheral T-cell survival." *Mol Cell Biol* **30**(3): 590-600.
- Lu, Y., J. Kitaura, T. Oki, Y. Komeno, K. Ozaki, M. Kiyono, H. Kumagai, H. Nakajima, T. Nosaka, H. Aburatani and T. Kitamura (2007). "Identification of TSC-22 as a potential tumor suppressor that is upregulated by Flt3-D835V but not Flt3-ITD." *Leukemia* **21**(11): 2246-57.
- Luciano, F., A. Jacquelin, P. Colosetti, M. Herrant, S. Cagnol, G. Pages and P. Auberger (2003). "Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function." *Oncogene* **22**(43): 6785-93.
- Mazzucchelli, R. I., S. Warming, S. M. Lawrence, M. Ishii, M. Abshari, A. V. Washington, L. Feigenbaum, A. C. Warner, D. J. Sims, W. Q. Li, J. A. Hixon, D. H. Gray, B. E. Rich, M. Morrow, M. R. Anver, J. Cherry, D. Naf, L. R. Sternberg, D. W. McVicar, A. G. Farr, R. N. Germain, K. Rogers, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and S. K. Durum (2009). "Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice." *PLoS One* **4**(11): e7637.
- Mittelstadt, P. R. and J. D. Ashwell (2001). "Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ." *J Biol Chem* **276**(31): 29603-10.
- Modur, V., R. Nagarajan, B. M. Evers and J. Milbrandt (2002). "FOXO proteins regulate tumor

- necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer." *J Biol Chem* **277**(49): 47928-37.
- Muller, O. G., R. G. Parnova, G. Centeno, B. C. Rossier, D. Firsov and J. D. Horisberger (2003). "Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺." *J Am Soc Nephrol* **14**(5): 1107-15.
- Nakashiro, K., H. Kawamata, S. Hino, D. Uchida, Y. Miwa, H. Hamano, F. Omotehara, H. Yoshida and M. Sato (1998). "Down-regulation of TSC-22 (transforming growth factor beta-stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line in vitro and in vivo." *Cancer Res* **58**(3): 549-55.
- Nasrin, N., S. Ogg, C. M. Cahill, W. Biggs, S. Nui, J. Dore, D. Calvo, Y. Shi, G. Ruvkun and M. C. Alexander-Bridges (2000). "DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10412-7.
- O'Connor, L., A. Strasser, L. A. O'Reilly, G. Hausmann, J. M. Adams, S. Cory and D. C. Huang (1998). "Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis." *EMBO J* **17**(2): 384-95.
- O'Reilly, L. A., L. Cullen, J. Visvader, G. J. Lindeman, C. Print, M. L. Bath, D. C. Huang and A. Strasser (2000). "The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells." *Am J Pathol* **157**(2): 449-61.
- Obsil, T. and V. Obsilova (2008). "Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors." *Oncogene* **27**(16): 2263-75.
- Ohta, S., Y. Shimekake and K. Nagata (1996). "Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter." *Eur J Biochem* **242**(3): 460-6.
- Ohta, S., K. Yanagihara and K. Nagata (1997). "Mechanism of apoptotic cell death of human gastric carcinoma cells mediated by transforming growth factor beta." *Biochem J* **324** (Pt 3): 777-82.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1353-62.
- Pellegrini, M., G. Belz, P. Bouillet and A. Strasser (2003). "Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14175-80.
- Perez, S. A., L. G. Mahaira, F. J. Demirtzoglu, P. A. Sotiropoulou, P. Ioannidis, E. G. Iliopoulou, A. D. Gritzapis, N. N. Sotiadiou, C. N. Baxevanis and M. Papamichail (2005). "A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival." *Blood* **106**(1): 158-66.
- Putcha, G. V., S. Le, S. Frank, C. G. Besirli, K. Clark, B. Chu, S. Alix, R. J. Youle, A. LaMarche, A. C. Maroney and E. M. Johnson, Jr. (2003). "JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis." *Neuron* **38**(6): 899-914.
- Reginato, M. J., K. R. Mills, J. K. Paulus, D. K. Lynch, D. C. Sgroi, J. Debnath, S. K. Muthuswamy and J. S. Brugge (2003). "Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis." *Nat Cell Biol* **5**(8): 733-40.
- Reiersen, H. and A. R. Rees (2001). "The hunchback and its neighbours: proline as an environmental modulator." *Trends Biochem Sci* **26**(11): 679-84.
- Rentsch, C. A., M. G. Cecchini, R. Schwaninger, M. Germann, R. Markwalder, M. Heller, G. van der Pluijm, G. N. Thalmann and A. Wetterwald (2006). "Differential expression of TGFbeta-stimulated clone 22 in normal prostate and prostate cancer." *Int J Cancer* **118**(4): 899-906.
- Robert-Nicoud, M., M. Flahaut, J. M. Elalouf, M. Nicod, M. Salinas, M. Bens, A. Doucet, P. Wincker, F. Artiguenave, J. D. Horisberger, A. Vandewalle, B. C. Rossier and D. Firsov (2001). "Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: effects of aldosterone and vasopressin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2712-6.

- Sabat, R., G. Grutz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk and J. Geginat (2011). "Biology of interleukin-10." Cytokine Growth Factor Rev **21**(5): 331-44.
- Salih, D. A. and A. Brunet (2008). "FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 126-36.
- Schluns, K. S. and L. Lefrancois (2003). "Cytokine control of memory T-cell development and survival." Nat Rev Immunol **3**(4): 269-79.
- Shi, X., W. Shi, Q. Li, B. Song, M. Wan, S. Bai and X. Cao (2003). "A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells." EMBO Rep **4**(4): 374-80.
- Shibanuma, M., T. Kuroki and K. Nose (1992). "Isolation of a gene encoding a putative leucine zipper structure that is induced by transforming growth factor beta 1 and other growth factors." J Biol Chem **267**(15): 10219-24.
- Shostak, K. O., V. V. Dmitrenko, O. M. Garifulin, V. D. Rozumenko, O. V. Khomenko, Y. A. Zozulya, G. Zehetner and V. M. Kavsan (2003). "Downregulation of putative tumor suppressor gene TSC-22 in human brain tumors." J Surg Oncol **82**(1): 57-64.
- Shostak, K. O., V. V. Dmitrenko, M. I. Vudmaska, V. G. Naidenov, A. V. Beletskii, T. A. Malisheva, V. M. Semenova, Y. P. Zozulya, J. Demotes-Mainard and V. M. Kavsan (2005). "Patterns of expression of TSC-22 protein in astrocytic gliomas." Exp Oncol **27**(4): 314-8.
- Sillard, R., P. Schulz-Knappe, P. Vogel, M. Raida, K. W. Bensch, W. G. Forssmann and V. Mutt (1993). "A novel 77-residue peptide from porcine brain contains a leucine-zipper motif and is recognized by an antiserum to delta-sleep-inducing peptide." Eur J Biochem **216**(2): 429-36.
- Soma, T., C. E. Dohrmann, T. Hibino and L. A. Raftery (2003). "Profile of transforming growth factor-beta responses during the murine hair cycle." J Invest Dermatol **121**(5): 969-75.
- Soundararajan, R., J. Wang, D. Melters and D. Pearce (2007). "Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms." J Biol Chem **282**(50): 36303-13.
- Soundararajan, R., T. T. Zhang, J. Wang, A. Vandewalle and D. Pearce (2005). "A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport." J Biol Chem **280**(48): 39970-81.
- Sprenger, C. C., K. Haugk, S. Sun, I. Coleman, P. S. Nelson, R. L. Vessella, D. L. Ludwig, J. D. Wu and S. R. Plymate (2009). "Transforming Growth Factor- β -Stimulated Clone-22 Is an Androgen-Regulated Gene That Enhances Apoptosis in Prostate Cancer following Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Inhibition." Clin Cancer Res **15**(24): 7634-7641.
- Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering and R. H. Medema (2002). "The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2." J Immunol **168**(10): 5024-31.
- Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.
- Strasser, A., P. J. Jost and S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-92.
- Strasser, A. and M. Pellegrini (2004). "T-lymphocyte death during shutdown of an immune response." Trends Immunol **25**(11): 610-5.
- Sugawara, F., Y. Yamada, R. Watanabe, N. Ban, K. Miyawaki, A. Kuroe, A. Hamasaki, H. Ikeda, T. Kurose, M. Usami, M. Ikeda and Y. Seino (2003). "The role of the TSC-22 (-396) A/G variant in the development of diabetic nephropathy." Diabetes Res Clin Pract **60**(3): 191-7.
- Sunters, A., S. Fernandez de Mattos, M. Stahl, J. J. Brosens, G. Zoumpoulidou, C. A. Saunders, P. J. Coffey, R. H. Medema, R. C. Coombes and E. W. Lam (2003). "FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines." J Biol Chem **278**(50): 49795-805.
- Tait, S. W. and D. R. Green (2010). "Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(9): 621-32.
- Tang, T. T., D. Dowbenko, A. Jackson, L. Toney, D. A. Lewin, A. L. Dent and L. A. Lasky (2002). "The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6

- transcriptional repressor." *J Biol Chem* **277**(16): 14255-65.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen and S. J. Martin (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 231-41.
- Tran, H., A. Brunet, J. M. Grenier, S. R. Datta, A. J. Fornace, Jr., P. S. DiStefano, L. W. Chiang and M. E. Greenberg (2002). "DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein." *Science* **296**(5567): 530-4.
- Treisman, J. E., Z. C. Lai and G. M. Rubin (1995). "Shortsighted acts in the decapentaplegic pathway in Drosophila eye development and has homology to a mouse TGF-beta-responsive gene." *Development* **121**(9): 2835-45.
- Trenkle, T., J. Welsh, B. Jung, F. Mathieu-Daude and M. McClelland (1998). "Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays." *Nucleic Acids Res* **26**(17): 3883-91.
- Tynan, S. H., S. G. Lundeen and G. F. Allan (2004). "Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen." *J Steroid Biochem Mol Biol* **91**(4-5): 225-39.
- Uchida, D., H. Kawamata, F. Omotehara, Y. Miwa, S. Hino, N. M. Begum, H. Yoshida and M. Sato (2000). "Over-expression of TSC-22 (TGF-beta stimulated clone-22) markedly enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in a human salivary gland cancer cell line." *Lab Invest* **80**(6): 955-63.
- Uchida, D., F. Omotehara, K. Nakashiro, Y. Tateishi, S. Hino, N. M. Begum, T. Fujimori and H. Kawamata (2003). "Posttranscriptional regulation of TSC-22 (TGF-beta-stimulated clone-22) gene by TGF-beta 1." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(4): 846-54.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach and R. Murray (1995). "Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine." *J Exp Med* **181**(4): 1519-26.
- Wang, F., C. B. Marshall, K. Yamamoto, G. Y. Li, M. J. Plevin, H. You, T. W. Mak and M. Ikura (2008). "Biochemical and structural characterization of an intramolecular interaction in FOXO3a and its binding with p53." *J Mol Biol* **384**(3): 590-603.
- Weber, A., S. A. Paschen, K. Heger, F. Wilfling, T. Frankenberg, H. Bauerschmitt, B. M. Seiffert, S. Kirschnek, H. Wagner and G. Hacker (2007). "BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins." *J Cell Biol* **177**(4): 625-36.
- Weidinger, C., K. Krause, A. Klagge, S. Karger and D. Fuhrer (2008). "Forkhead box-O transcription factor: critical conductors of cancer's fate." *Endocr Relat Cancer* **15**(4): 917-29.
- Wojciechowski, S., M. B. Jordan, Y. Zhu, J. White, A. J. Zajac and D. A. Hildeman (2006). "Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory." *Eur J Immunol* **36**(7): 1694-706.
- Wu, X., M. Yamada-Mabuchi, E. J. Morris, P. S. Tanwar, L. Dobens, S. Gluderer, S. Khan, J. Cao, H. Stocker, E. Hafen, N. J. Dyson and L. A. Raftery (2008). "The Drosophila homolog of human tumor suppressor TSC-22 promotes cellular growth, proliferation, and survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(14): 5414-9.
- Xu, Y., S. Iyengar, R. L. Roberts, S. B. Shappell and D. M. Peehl (2003). "Primary culture model of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity in prostate cancer cells." *J Cell Physiol* **196**(1): 131-43.
- Yachi, K., K. Inoue, H. Tanaka, H. Yoshikawa and M. Tohyama (2007). "Localization of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expressing neurons in the central nervous system and its relationship to the stress response." *Brain Res* **1159**: 141-7.
- Yamamura, Y., W. L. Lee, K. Inoue, H. Ida and Y. Ito (2006). "RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells." *J Biol Chem* **281**(8): 5267-76.
- Yang, J. Y., C. S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J. Y. Lang, C. C. Lai, C. J. Chang, W. C. Huang, H. Huang, H. P. Kuo, D. F. Lee, L. Y. Li, H. C. Lien, X. Cheng, K. J. Chang, C. D. Hsiao, F. J. Tsai, C. H. Tsai, A. A. Sahin, W. J. Muller, G. B. Mills, D. Yu, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2008). "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation." *Nat Cell Biol* **10**(2): 138-48.

- Yang, N., W. Zhang and X. M. Shi (2008). "Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression." J Cell Biochem **103**(6): 1760-71.
- Yang, Y. H., D. Aeberli, A. Dacumos, J. R. Xue and E. F. Morand (2009). "Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper." J Immunol **183**(2): 1435-45.
- Yoshimura, A., Y. Wakabayashi and T. Mori (2011). "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta." J Biochem **147**(6): 781-92.
- You, H., M. Pellegrini, K. Tsuchihara, K. Yamamoto, G. Hacker, M. Erlacher, A. Villunger and T. W. Mak (2006). "FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal." J Exp Med **203**(7): 1657-63.
- Yu, J., M. Ershler, L. Yu, M. Wei, B. Hackanson, A. Yokohama, T. Mitsui, C. Liu, H. Mao, S. Liu, Z. Liu, R. Trotta, C. G. Liu, X. Liu, K. Huang, J. Visser, G. Marcucci, C. Plass, A. V. Belyavsky and M. A. Caligiuri (2009). "TSC-22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia." Blood **113**(22): 5558-67.
- Zen, M., M. Canova, C. Campana, S. Bettio, L. Nalotto, M. Rampudda, R. Ramonda, L. Iaccarino and A. Doria (2011). "The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system." Autoimmun Rev **10**(6): 305-10.
- Zhu, Y., B. J. Swanson, M. Wang, D. A. Hildeman, B. C. Schaefer, X. Liu, H. Suzuki, K. Mihara, J. Kappler and P. Marrack (2004). "Constitutive association of the proapoptotic protein Bim with Bcl-2-related proteins on mitochondria in T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7681-6.
- Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli and R. C. Armstrong (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." J Biol Chem **278**(10): 8091-8.

◆ Résumé de la thèse

Les protéines GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) et TSC-22 (Transforming growth factor- β Stimulated Clone-22) appartiennent à la famille de protéines TSC-22D (TSC-22 Domain). GILZ a été décrit précédemment comme étant induit au cours de la déprivation en interleukine-2 (IL-2) des lymphocytes de la lignée cellulaire CTLL-2, permettant ainsi de retarder leur apoptose. Le but de notre travail était de déterminer les rôles respectifs de GILZ et TSC-22 au cours de l'apoptose des cellules CTLL-2.

Nos résultats ont permis de montrer que TSC-22 augmentait l'apoptose induite par la déprivation en IL-2 des cellules CTLL-2. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'activation des caspases ainsi qu'une régulation positive de l'expression de BIM. Nous avons en outre montré que l'expression de GILZ, protéine anti-apoptotique, induite lors de la déprivation en IL-2, était régulée négativement en présence de TSC-22. Enfin, nous avons montré que l'expression de l'ARNm de *gilz* était régulée négativement par TSC-22, mais que la stabilité de son ARNm n'était pas modifiée.

Notre travail a donc permis de montrer que TSC-22 accélère l'entrée en apoptose des lymphocytes T en régulant négativement l'expression de la protéine anti-apoptotique GILZ.

◆ Mots clés relatifs au sujet de la thèse

TSC-22 (Transforming growth factor- β Stimulated Clone-22)

GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper)

FOXO (Forkhead box class O)

Apoptose

BIM

Lymphocytes T

◆ Nom du laboratoire de rattachement

UMR-S 996 « Cytokines, Chimiokines et Immunopathologie »

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex